

---

# **Untersuchungen zur Beteiligung der Lysosomen und des Cytoskeletts an der kälteinduzierten Zell- und Gewebeschädigung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Sven Knoop

geboren in Bottrop

Institut für Physiologische Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

2011

---

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2006 bis Juli 2011 im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Rauen am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 12.09.2011

Gutachter: Prof. Dr. U. Rauen  
Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann  
Vorsitzende: Prof. Dr. B. Siebers

---



---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Konservierungsschädigung</b>	<b>1</b>
1.1.1. Zellschädigung durch Hypoxie/Reoxygenierung	1
1.1.2. Kälteschädigung	2
1.1.3. Zell- und Gewebeschädigung durch eine der frühen Zellschädigung folgende Entzündungsreaktion	3
<b>1.2. Mechanismen der kälteinduzierten Zellschädigung/Apoptose</b>	<b>3</b>
1.2.1. Eisenabhängige kälteinduzierte Zellschädigung	3
1.2.1.1. Der chelatisierbare Eisenpool und mögliche Quellen der kälteinduzierten Eisenfreisetzung	5
1.2.1.2. Lysosomen als mögliche Quelle chelatisierbaren Eisens	6
1.2.2. Eisenunabhängige Komponente der kälteinduzierten Schädigung des Hepatozyten	7
<b>1.3. Kälteinduzierte Endothelschädigung</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Die endotheliale Schrankenfunktion</b>	<b>10</b>
1.4.1. Das Cytoskelett	10
1.4.2. Mechanismen einer endothelialen Permeabilitätserhöhung	16
<b>2. Problemstellung</b>	<b>19</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Auswirkungen der Kaltinkubation auf den lysosomalen chelatisierbaren     Eisenpool des Hepatozyten</b>	<b>20</b>
3.1.1. Der lysosomale chelatisierbare Eisenpool des Hepatozyten in der Wärme	20
3.1.2. Der lysosomale chelatisierbare Eisenpool des Hepatozyten in der Kälte	20
<b>3.2. Lysosomale Schädigung während der Kaltinkubation des Hepatozyten</b>	<b>23</b>
3.2.1. Kälteinduzierte lysosomale Permeabilisierung	23

---

---

3.2.2. Hemmung der kälteinduzierten lysosomalen Permeabilisierung durch einen Eisenchelator und einen Cathepsin B-Inhibitor	23
3.2.3. Untersuchungen zur Beteiligung von Caspase 8 an der lysosomalen Schädigung	25
3.2.4. Chloridabhängigkeit der lysosomalen Schädigung in der Kälte	25
<b>3.3. Kälteinduzierter Verlust der endothelialen Schrankenfunktion</b>	<b>28</b>
3.3.1. Kälteinduzierte Zellschädigung von Schweineaortenendothelzellen	28
3.3.2. Kälteinduzierte morphologische Veränderungen an Schweineaortenendothelzellen	29
3.3.3. Veränderung des Aktin-Cytoskeletts während der Kaltinkubation und nachfolgender Wiedererwärmung	32
3.3.4. Auswirkungen einer chloridfreien Inkubation auf die kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie und des Aktin-Cytoskeletts	35
3.3.5. Permeabilitätsmessungen an endothelialen Monolayern	38
3.3.6. Untersuchungen zum Einfluss bekannter Mechanismen einer endothelialen Permeabilitätssteigerung auf den kälteinduzierten Aktinabbau	38
3.3.7. Einfluss von Heat Shock Protein 90-Inhibitoren auf die Aktinfaserstruktur und die endotheliale Schrankenfunktion in der Kälte	45
3.3.8. Beteiligung der Mikrotubuli an den kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts und der endothelialen Schrankenfunktion	47
3.3.9. Beteiligung von MAP-Kinasen an den kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts und der endothelialen Schrankenfunktion	52
3.3.10. Effekt der Kaltinkubation auf die Umverteilung des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin	59
3.3.11. Umverteilung der junctionalen Proteine ZO-1 und VE-Cadherin in der Kälte	59
3.3.12. Beteiligung von p38-MAPK am kälteinduzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion im Gefäßmodell	63
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Lysosomen als mögliche Quelle des kälteinduzierten Anstiegs des cytosolischen</b>	

---

---

<b>chelatisierbaren Eisenpools</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Lysosomale Komponente der kälteinduzierten Zellschädigung</b>	<b>67</b>
<b>4.3. Kälteinduzierter Verlust der endothelialen Schrankenfunktion</b>	<b>70</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6. Material und Methoden</b>	<b>81</b>
<b>6.1. Material</b>	<b>81</b>
6.1.1. Chemikalien	81
6.1.2. Zellkulturgefäße und sonstige Materialien	82
6.1.3. Versuchstiere	83
<b>6.2. Methoden</b>	<b>83</b>
6.2.1. Zellpräparation und Zellkultivierung	83
6.2.1.1. Präparation und Kultivierung von Hepatozyten	83
6.2.1.2. Präparation und Kultivierung von Schweineaortenendothelzellen	84
6.2.2. Zusammensetzung verwendeter Lösungen	85
6.2.3. Allgemeines experimentelles Vorgehen	86
6.2.4. Quantifizierung der Zellschädigung durch Bestimmung der LDH-Freisetzung	88
6.2.5. Bestimmung der Zellmorphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie	88
6.2.6. Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in den Lysosomen primärer Hepatozyten in der Wärme und nach Kaltinkubation	89
6.2.7. Bestimmung der lysosomalen Integrität nach Kaltlagerung	91
6.2.8. Fixieren von Zellen und Geweben	92
6.2.9. Fluoreszenzmarkierung von Cytoskelett-Bestandteilen und junctionalen Proteinen	92
6.2.9.1. Aktin	92
6.2.9.2. $\alpha$ -Tubulin	93
6.2.9.3. VE-Cadherin, ZO-1 und Paxillin	93
6.2.10. Permeabilitätsbestimmung an endothelialen Monolayern	94

---

---

6.2.11. Permeabilitätsbestimmung an Segmenten der Schweineaorta	95
6.2.12. Zelllyse und Proteinbestimmung nach Bradford	95
6.2.13. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	96
6.2.14. Western Blot	97
<b>7. Literatur</b>	<b>99</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>112</b>
<b>8.1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>8.2. Publikationen</b>	<b>114</b>
<b>8.3. Lebenslauf</b>	<b>115</b>
<b>8.4. Erklärung</b>	<b>116</b>
<b>8.5. Danksagung</b>	<b>117</b>

---

## **1. Einleitung**

### **1.1. Konservierungsschädigung**

Kälte wird häufig zur Konservierung von Zellen, Geweben oder Organen eingesetzt. Die niedrigen Temperaturen sollen vor allem eine Verlangsamung des Metabolismus und damit einen erniedrigten Sauerstoffbedarf und eine Verzögerung der durch Substrat- und Energiemangel bei der Lagerung induzierten Schädigungsprozesse bewirken. Die Kälte (ca. 4°C) kann aber auch selbst zu einer Schädigung von Zellen/Geweben führen, so dass man grundsätzlich drei Wege der Organschädigung bei/nach der kalten Ischämie/warmen Reperfusion unterscheiden kann: erstens eine durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierte Schädigung, zweitens eine durch die Kälte und die spätere Wiedererwärmung verursachte Schädigung sowie eine durch diese frühen Zellschädigungen hervorgerufene Entzündungsreaktion.

#### **1.1.1. Zellschädigung durch Hypoxie/Reoxygenierung**

Ein durch Ischämie (Minderdurchblutung) verursachter Sauerstoffmangel (Hypoxie) führt zu einer Blockade der mitochondrialen Atmungskette. Dies induziert zunächst einen massiven Abfall der ATP-Synthese und in der Folge eine Hemmung aller energieabhängigen Prozesse. Es wurde angenommen, dass es durch Inhibition ATP-abhängiger Ionentransporter zu einer Störung der zellulären Ionenhomöostase kommt, speziell zu einer cytosolischen Akkumulation von Natrium und Calcium (8,29). Aus der Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration können eine mitochondriale Calciumüberladung sowie eine Aktivierung calciumabhängiger Hydrolasen, wie der Phospholipase A<sub>2</sub> und der Calpaine, resultieren. Calpaine können wiederum einen nekrotischen oder über Bax oder Bid einen apoptotischen Zelluntergang auslösen. Die cytosolische Natriumakkumulation beruht zu einem kleinen Teil auf einem Ausfall der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, verläuft aber hauptsächlich über die Hypoxie-induzierte Ausbildung einer unspezifischen Membranpore, welche für kleine Ionen einschließlich Natrium durchlässig ist (42). Es wurde gezeigt, dass die Aminosäure Glycin in der Lage ist, die Ausbildung dieser unspezifischen Membranpore zu hemmen. Auf welchem Weg eine Erhöhung der Natriumkonzentration zu einer Zellschädigung führt, ist

noch relativ unbekannt, jedoch kann die Hypoxie-induzierte Zellschädigung durch den Einsatz natriumfreier Medien deutlich verringert werden (42). Außerdem kommt es durch den ATP-Abfall zum Zerfall von Cytoskelettelementen, was zu einer Bildung von Plasmamembranausstülpungen (Blebs) sowie zu einer intrazellulären Azidose führt (85,132). Die durch Reperfusion erfolgende Reoxygenierung führt zu weiteren Schädigungsmechanismen, die vor allem auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen sind (29,31). Eine Theorie beruht auf der potentiellen Konversion des Enzyms Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase. Während Xanthindehydrogenase unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH/H}^+$  Xanthin zu Harnsäure oxidiert, geschieht der gleiche Vorgang bei Xanthinoxidase unter Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionradikalen. Dies führt zu einer vermehrten Lipidperoxidation (29). Die nach heutiger Ansicht wichtigere Quelle von ROS ist jedoch die durch strukturelle Veränderungen gestörte mitochondriale Atmungskette. Infolge der Freisetzung von ROS, der mitochondrialen Calciumüberladung und weiteren begünstigenden Faktoren kann es zum mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) kommen, welcher, in Abhängigkeit vom Energiestatus, sowohl zu einem nekrotischen als auch einem apoptotischen Zelltod führen kann (74).

### **1.1.2. Kälteschädigung**

Die oben aufgeführten Schädigungsmechanismen, die auf Energiemangel zurückzuführen sind, lassen sich durch den Einsatz von Hypothermie deutlich vermindern, da so der zelluläre Energiebedarf gesenkt wird. Die eigentlich zur Protektion eingesetzte Kälte stellt aber auch einen neuen Schädigungsfaktor dar. Lange Zeit wurde der Mechanismus der Kälteschädigung auf einen rein nekrotischen Vorgang zurückgeführt. Eine durch Kälte verursachte Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität sollte danach zu einer intrazellulären Natriumakkumulation mit einem folgenden  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Influx und somit zu einem zellulären Ödem führen (8,29,60). Neuere Arbeiten zeigen hingegen, dass es sich um eine durch ROS vermittelte Schädigung vorwiegend apoptotischer Natur handelt (120,121,124-126). Der apoptotische Zelluntergang, auch programmierter Zelltod genannt, kann im Wesentlichen über einige morphologische Kriterien von der Nekrose abgegrenzt werden. Der apoptotische Zelltod ist geprägt durch Ausbildung von apoptotischen Körperchen und einer Chromatin- und Kernkondensation, und verläuft aufgrund der länger erhalten bleibenden Integrität der Zellmembran weitgehend ohne

eine inflammatorische Begleitreaktion. Die Details dieser kälteinduzierten Zellschädigung sind unter 1.2. dargestellt.

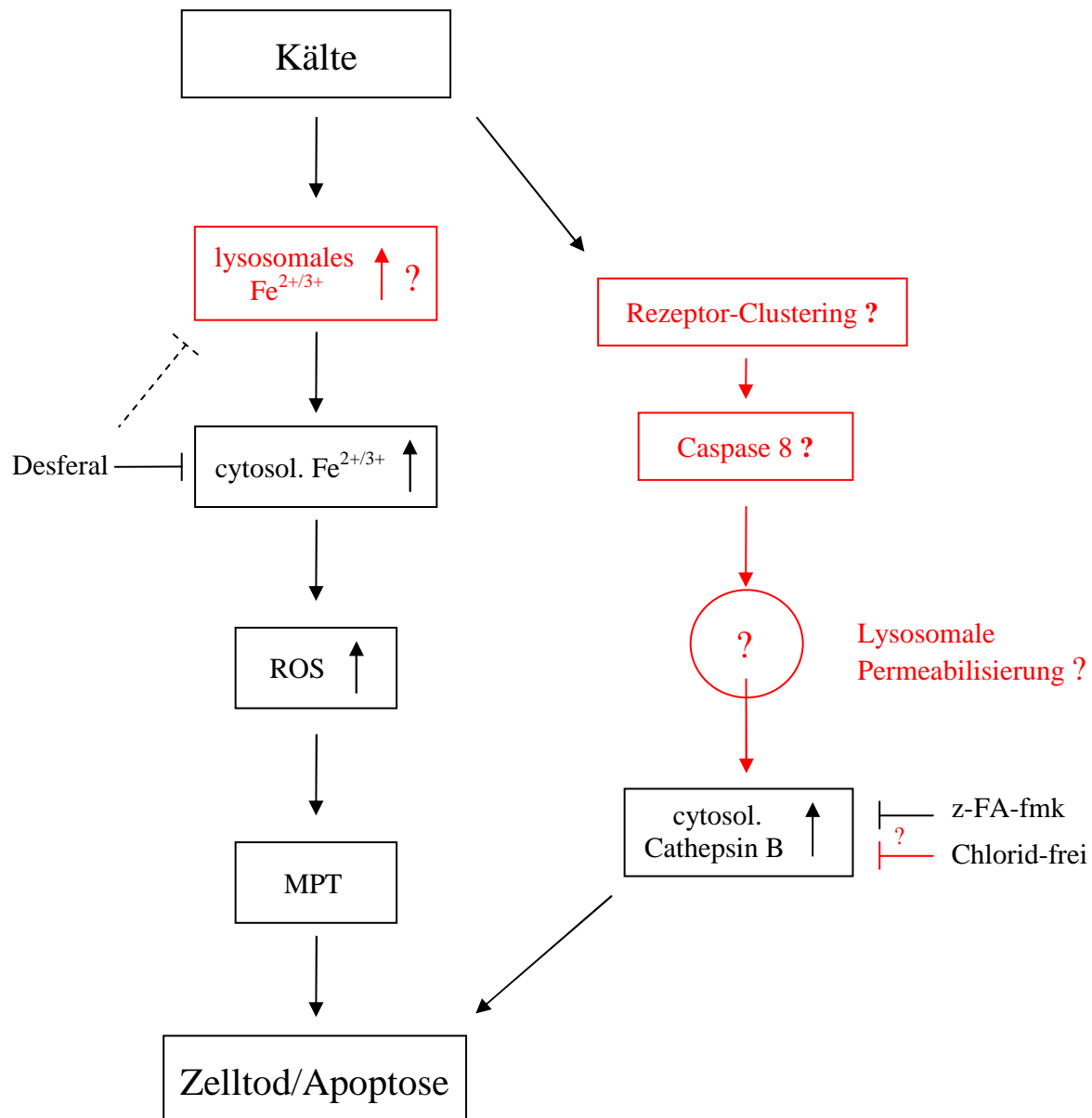
### **1.1.3. Zell- und Gewebeschädigung durch eine der frühen Zellschädigung folgende Entzündungsreaktion**

Durch die während der kalten Ischämie und der Reperfusion entstandene Zellschädigung kommt es bei Reperfusion ‚*in vivo*‘ zu einem inflammatorischen Geschehen mit einer Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen, die über eine zusätzliche Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu weiterer Zellschädigung beitragen (66).

## **1.2. Mechanismen der kälteinduzierten Zellschädigung/Apoptose**

### **1.2.1. Eisenabhängige kälteinduzierte Zellschädigung**

Als Hauptmechanismus der kälteinduzierten Apoptose hat sich ein Anstieg der zellulären chelatisierbaren Eisenionen in der Kälte herausgestellt (Abb. 1) (123-126). Unter dem zellulären chelatisierbaren Eisenpool versteht man zelluläre Eisenionen, welche nicht fest an Proteine gebunden, sondern eher locker an Makromoleküle oder an niedermolekulare Chelatoren wie z.B. Citrat oder Phosphat assoziiert sind (70,113,123). Der kälteinduzierte Anstieg des redoxaktiven Eisenpools führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Eisen-Sauerstoff-Spezies (119). Biologisch wichtige ROS sind zum Beispiel Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) und das Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Außerdem konnte, als weitere wichtige Komponente im Mechanismus der kälteinduzierten Zellschädigung, gezeigt werden, dass der kälteinduzierte Anstieg der chelatisierbaren Eisenionen zu einem mitochondrialen Permeabilitätsübergang führt und nachfolgend eine Apoptose auslöst (69).



**Abb. 1: Zusammenfassung der bekannten Befunde zur eisenabhängigen und eisenunabhängigen kälteinduzierten Schädigung des Hepatozyten.**

Durch Kälte werden in primären Rattenhepatozyten zwei Hauptschadigungswege ausgelöst. Eine eisenabhängige Schädigung, die über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und einen nachfolgenden mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) vermittelt wird, und eine eisenunabhängige Schädigung, die über Cathepsin B vermittelt wird. Die Arbeitshypothesen zu noch unbekannten Komponenten sind in rot dargestellt.

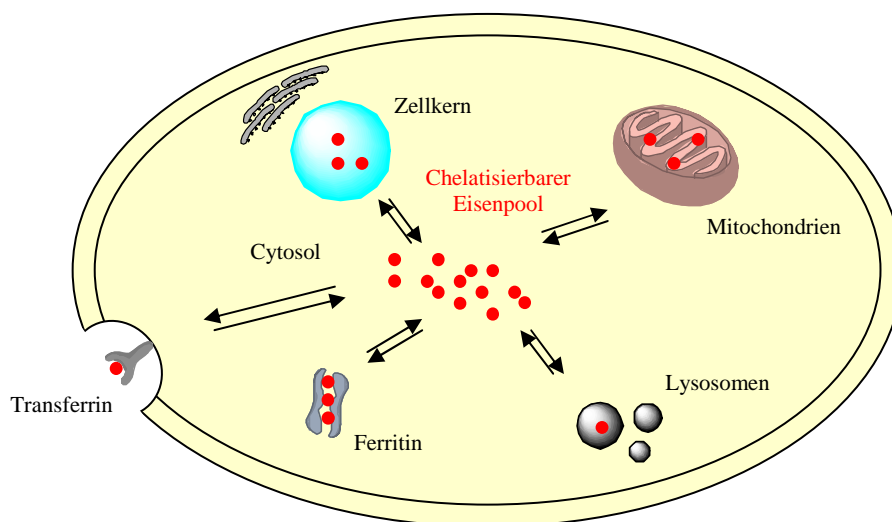
Das Ausmaß der kälteinduzierten Apoptose ist abhängig von der Dauer der Kaltinkubation der Zellen und kann durch den Einsatz von Eisenchelatoren - je nach Zelltyp komplett oder partiell (eisenunabhängige Komponente, siehe 1.2.2.) - gehemmt werden (70,125,126,129). Die kälteinduzierte Apoptose konnte sowohl in „physiologischen“ Medien wie Zellkulturmedium und Krebs-Henseleit-Puffer, als auch in den in der Klinik verwendeten Konservierungslösungen wie UW (University of Wisconsin-Lösung) oder HTK (Histidin-



Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung) nachgewiesen werden. Eine unmittelbar nachfolgende Wiedererwärmungsphase auf physiologische Temperaturen, wie sie bei der Reperfusion von Organen auftritt, verstärkte dabei die Zellschädigung noch einmal beträchtlich (124,82).

### 1.2.1.1. Der chelatisierbare Eisenpool und mögliche Quellen der kälteinduzierten Eisenfreisetzung

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der chelatisierbare Eisenpool in Hepatozyten und Leberendothelzellen nicht nur cytosolisch, sondern auch kompartimentiert im Zellkern, den Mitochondrien und in den Lysosomen/Endosomen vorliegt ((Abb. 2; (111,112))).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools.**

Eisen wird durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und dann über einen Übergangspool in Speicherproteine wie Ferritin aufgenommen. Intrazelluläres chelatisierbares Eisen liegt in der Zelle jedoch nicht nur cytosolisch vor, sondern ist auch in den Mitochondrien, dem Zellkern und in den Lysosomen/Endosomen lokalisiert. Einzelheiten siehe Text.

Welches die Quelle des kälteinduzierten Anstiegs chelatisierbaren Eisens ist, konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Der cytosolische und der nukleäre chelatisierbare Eisenpool stiegen bei der Kaltinkubation von Hepatozyten schon nach einer kurzen Inkubationszeit von unter einer Stunde stark an (123). Eine Beteiligung mitochondrialen chelatisierbaren Eisens konnte mittels einer eisenabhängigen mitochondrialen Fluoreszenzsonde sowie mittels

spezifischer mitochondrialer Eisenchelatoren ausgeschlossen werden. Der mitochondriale chelatisierbare Eisenpool blieb während der Kaltinkubation unverändert (128). Als weitere mögliche Quellen chelatisierbaren Eisens wurden Ferritin (172), Cytochrom P-450 (63) und die Lysosomen (79,80) vorgeschlagen.

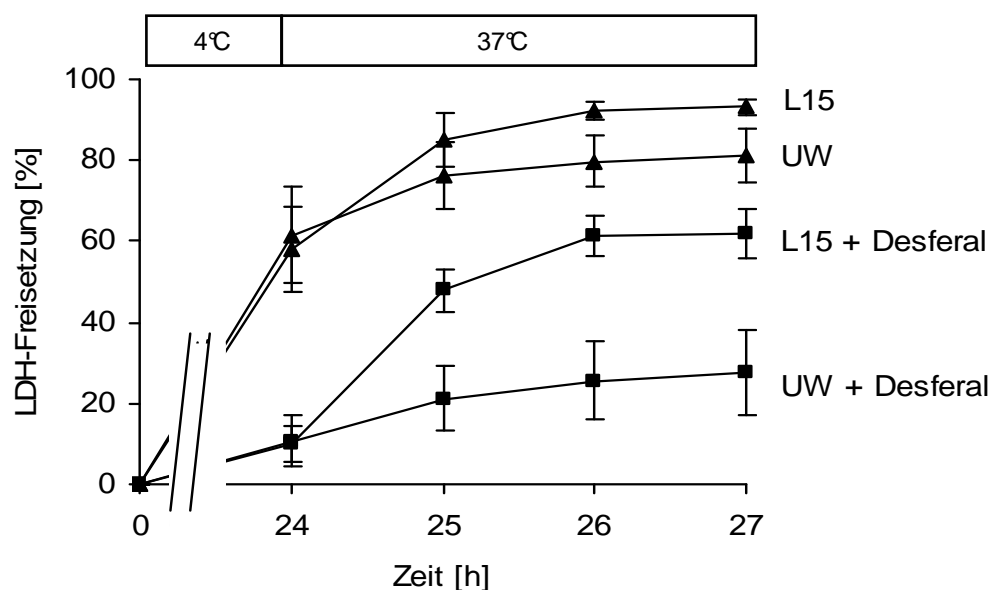
#### **1.2.1.2. Lysosomen als mögliche Quelle chelatisierbaren Eisens**

Lysosomen sind kleine, mehr oder weniger kugelförmige Zellorganellen mit einem mittleren Durchmesser von ca. 100 bis 500 nm. Sie werden vom Golgi-Apparat abgeschnürt und enthalten in hohen Konzentrationen abbauende Enzyme, welche ursprünglich aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum stammen (24). Lysosomen sind in allen Zellen des Körpers mit Ausnahme von Erythrozyten vorhanden, besonders zahlreich jedoch z.B. in Makrophagen sowie anderen phagozytierenden Zellen. Ansonsten findet man sie relativ häufig in Zellen der Leber und Niere sowie in Nervenzellen (24). Zu den ca. 50 verschiedenen Enzymen, die bisher in Lysosomen nachgewiesen wurden, zählen z.B. Phosphatasen, Proteasen, Esterasen, Phospholipasen und Kollagenasen. Diese Enzyme haben ihr Wirkungsoptimum im sauren Bereich bei pH 4-5, welcher durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe aufrechterhalten wird, die in der Membran des Organells angesiedelt ist. Die Lysosomenmembran beinhaltet stark glykosylierte integrale Proteine, deren Kohlenhydratketten vermutlich eine schützende innere Schicht bilden, welche die Membran vor Angriffen durch die in ihr eingeschlossenen Enzyme abschirmt. Lysosomen dienen vor allem dem intrazellulären Abbau zellfremder organischer Substanzen, die von der Zelle aufgenommen wurden, und dem Abbau zelleigenen Materials. Dabei wird ein Zellorganell in eine Doppelmembran eingeschlossen, welche anschließend mit einem Lysosom verschmilzt, wobei ein Autophagolysosom entsteht. Nach dem Verdauungsvorgang wird sein Inhalt durch Exocytose aus der Zelle ausgeschleust oder verbleibt in der Zelle. Es können aber nicht nur Organellen aus dem Zellinneren phagozytiert werden, sondern auch Teilchen aus der Zellumgebung. Durch diesen kontinuierlichen Abbau von zelleigenem und zellfremdem Material in den Lysosomen ist davon auszugehen, dass in den Lysosomen eine große Anzahl von eisenhaltigen Proteinen wie Hämoglobin, Ferritin usw. vorhanden sind, welche von den sauren Hydrolasen abgebaut werden und zu einem großen chelatisierbaren Eisenpool führen könnten (79,80). Ob dieser lysosomale chelatisierbare Eisenpool bei einer Freisetzung durch eine Schädigung der Lysosomen zu

einer Erhöhung des cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools in der Kälte führen, und damit zu einer Zellschädigung beitragen kann ist bisher noch unbekannt.

### 1.2.2. Eisenunabhängige Komponente der kälteinduzierten Schädigung des Hepatozyten

In Rattenhepatozyten konnte außerdem eine zusätzliche eisenunabhängige Komponente der Zellschädigung gezeigt werden (70,124). Diese Komponente tritt während der Wiedererwärmungsphase hauptsächlich nach Kaltinkubation in „physiologisch“ zusammengesetzten Lösungen wie Zellkulturmedium und Krebs-Henseleit (KH)-Puffer in Gegenwart eines Eisenchelators auf. In chloridfreien Medien sowie in speziellen Organprotektionslösungen wie University of Wisconsin (UW)-Lösung (chloridfrei) ist diese Komponente nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 3).



**Abb. 3: Vitalitätsverlust von primären Rattenhepatozyten bei der Kaltinkubation und bei nachfolgender Wiedererwärmung.**

Kultivierte primäre Hepatozyten wurden für 24 Stunden bei 4°C in L15-Zellkulturmedium oder University of Wisconsin (UW)-Lösung inkubiert und dann in L15-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt. Einigen Ansätzen wurde der Eisenchelator Desferal zugesetzt (1 mM). Der Vitalitätsverlust wurde über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase ermittelt (Quelle: Knoop; Diplomarbeit).

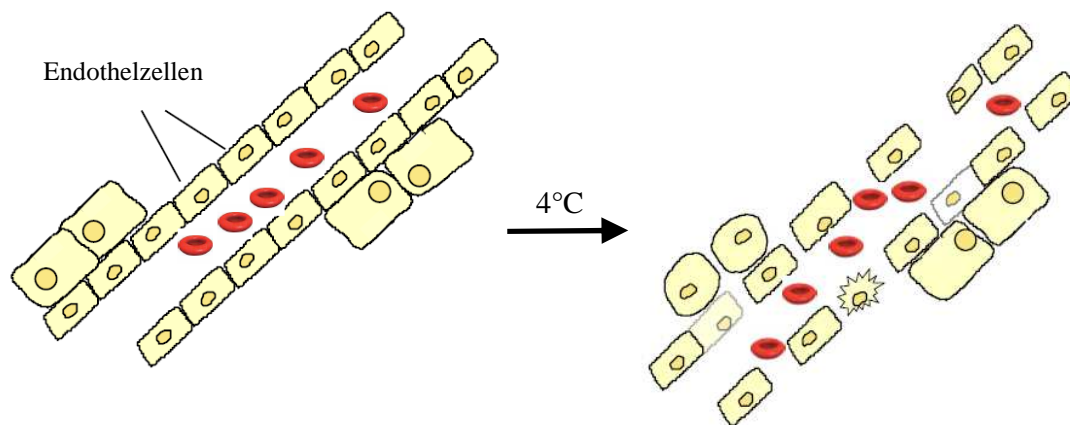
Die Hemmung dieser Schädigungskomponente durch den Cathepsin B-Inhibitor z-FA-fmk und weitere Untersuchungen, die zeigten, dass während der Kaltinkubation eine Umverteilung von Cathepsin B aus den Lysosomen in das Cytosol stattfindet, lassen eine Beteiligung der Lysosomen an der eisenunabhängigen Komponente der kälteinduzierten Zellschädigung vermuten (Li, Rauen, unveröffentlicht). Eine Hypothese ist, dass die Umverteilung von Cathepsin B in das Cytosol auf einem temperaturbedingten Phasenübergang der Plasmamembran mit nachfolgendem Rezeptor-Clustering beruht, ähnlich wie es für eine gallensäureinduzierte Apoptose beschrieben wurde (41). Eine nachfolgende Caspase 8-Aktivierung könnte dann, wie bei der gallensäureinduzierten Apoptose, das pro-apoptotische Protein Bid zu tBid spalten, welches in die lysosomale Membran inseriert und zu einer Cathepsin B-Freisetzung führt (53,164) (Abb. 1). Untersuchungen zur lysosomalen Integrität während der Kaltinkubation des Rattenhepatozyten existieren jedoch noch nicht.

### **1.3. Kälteinduzierte Endothelschädigung**

Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass speziell das Endothel sehr sensitiv gegenüber der Kaltlagerung und insbesondere gegenüber der eisenabhängigen Kälteschädigung ist (70,124). Endothelzellen gelten als ein bedeutendes Ziel der Konservierungsschädigung von Transplantaten und damit auch eines Transplantatversagens (25,90). Konservierung in der Kälte resultiert zunächst in reversiblen Veränderungen wie einer zellulären Schwellung und Veränderungen der intrazellulären Organellen. Später wurden eine partielle Degradation der Endothelzellen, eine Ablösung der Zellen mit nukleären Veränderungen und der fast vollständigen Ablösung der sinusoidalen Schicht (Leber) beobachtet (92) (Abb. 4).

Weiterhin wurde von diversen Arbeitsgruppen gezeigt, dass es während der Kaltlagerung von Endothelzellen sowohl zu einem Abbau bzw. einer Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts als auch der Mikrotubuli kommt (23,27,56,57,73,89,147,152). So konnten Suzuki et al. zeigen, dass bei HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) schon eine relativ kurze Zeitspanne von zwei Stunden bei 4°C zu einem Abbau der Mikrotubuli mit gleichzeitigem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion führt (147). In der Kälte kommt es auch zu einem Abbau von F-Aktin und zu einer Aktin-Kondensation (23,27,56). Dabei ist die Geschwindigkeit dieses Vorgangs abhängig vom Zelltyp und der in diesen Studien zur

Kaltlagerung verwendeten Lösung. Die Desintegration des Cytoskeletts geht mit einer Lückenbildung im endothelialen Monolayer und damit einem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion einher. Versuche mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen für die Proteine der Tight Junctions und der Adherens Junctions zeigen auch hier eine Umverteilung in der Kälte. Trocha et al. konnten eine deutliche Abnahme von Occludin und VE-Cadherin nach einer Kaltlagerung von HUVECs über sechs Stunden in UW-Lösung demonstrieren (152). Brinkkoetter et al. haben gezeigt, dass das Färbungsmuster von VE-Cadherin und ZO-1 während der Kaltlagerung von einem kontinuierlichen Band an den Zell-Zell-Kontakten zu einem diskontinuierlichen wechselt (23).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der kälteinduzierten Endothelschädigung.**

Das Gefäßendothel reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut. Kaltlagerung von Organtransplantaten führt zu einer Schädigung des Endothels und einer Einschränkung der endothelialen Schrankenfunktion.

Gleichwohl wurde in diesen Studien nicht unterschieden, welche Vorgänge ein Ausdruck zunehmender (eisenabhängiger) Endothelzellschädigung sind, und welche Vorgänge durch einen anderen Prozess getriggert werden und möglicherweise bei einer Hemmung der Zellschädigung reversibel sind. Während für die kälteinduzierte Zellschädigung und morphologische Veränderungen im Sinne der Apoptose (Blebbing, Veränderungen des Zellkerns, Bildung apoptotischer Körperchen) gezeigt werden konnte, dass sie auf der eisenabhängigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beruhen, ist für die Retraktion der Zellen und die Lückenbildung im endothelialen Monolayer noch nicht bekannt, ob sie durch den Zusatz eines Eisenchelators verhindert werden können. Befunde an einem epithelialen

Zelltyp (Corneaendothelzellen) deuten darauf hin, dass es möglicherweise eisenunabhängige und damit schädigungsunabhängige Mechanismen einer kälteinduzierten Zellretraktion und Lückenbildung gibt (129).

#### **1.4. Die endotheliale Schrankenfunktion**

Das Endothel von Blutgefäßen bildet eine semipermeable Barriere zwischen Blut und dem umliegenden Gewebe. Dabei ist die endotheliale Schrankenfunktion in den verschiedenen Blutgefäßen des Kreislaufs nicht gleichmäßig ausgeprägt – Makromoleküle können das Endothel in Venen einfacher durchdringen als in Arterien und mikrovaskuläre Endothelzellen haben eine deutlich stärkere Schrankenfunktion als makrovaskuläre Endothelzellen (38,93). Die Unversehrtheit des endothelialen Monolayers ist eine Grundvoraussetzung für eine geregelte Funktion des Blutgefäßes. Kommt es zu einer Endothelschädigung mit dem Zusammenbruch der endothelialen Schrankenfunktion, folgt ein Verlust der selektiven Permeabilität dieser endothelialen Grenzschicht. Der Austritt von intravaskulärer Flüssigkeit und Proteinen in den interstitiellen Raum kann in der Folge eine Ödembildung und der Austritt von Zellen eine inflammatorische Reaktion verursachen. Außerdem führt eine Endothelschädigung/-ablösung zu einer Freilegung der extrazellulären Matrix, was dann zu einer erhöhten Thrombozytenadhäsion, und somit zu Thrombosen mit anschließendem Gefäßverschluss und nachfolgendem Organversagen führen kann (140,148).

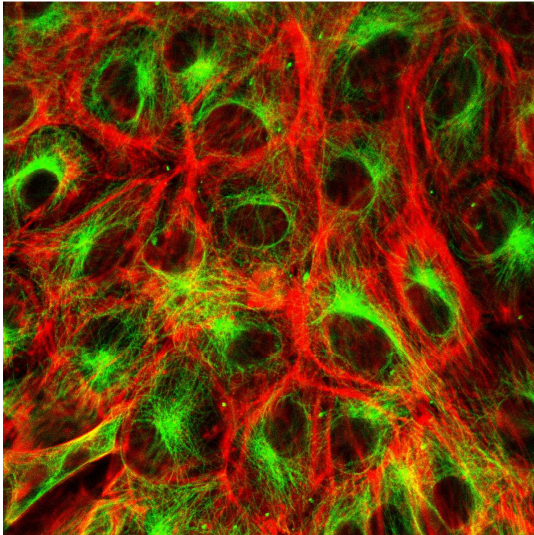
##### **1.4.1. Das Cytoskelett**

Eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der endothelialen Schrankenfunktion wird dem Cytoskelett zugeschrieben (19,78,93,162). Das Cytoskelett besteht aus drei primären Elementen: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Abb. 5).

##### **Aktin**

Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus kleineren Untereinheiten (G-Aktin) und werden ständig auf- und abgebaut. Aktinmonomere, an die ein Adenosintriphosphat (ATP) gebunden ist, lagern sich an F-Aktin an und spalten dabei einen Phosphatrest ab ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ ). Da

alle Monomere dabei die gleiche Orientierung haben, besitzen die Filamente eine Polarität, mit einem Plusende und einem Minusende. Aktinfilamente werden am Plusende deutlich schneller aufgebaut als am Minusende. Die einzelnen Monomere können somit am Plusende angelagert werden, wandern durch das komplette Filament, lösen sich am Minusende wieder ab und können am Plusende erneut eingebaut werden. Dieser kreisförmige Mechanismus wird auch „treadmilling“ (Tretmühlenmechanismus) genannt (Abb. 6).



**Abb. 5: Das Cytoskelett.**

Doppelfärbung eines endothelialen Monolayers. Aktin wurde mit einem rot fluoreszierenden Phalloidin-Konjugat angefärbt und die Mikrotubuli mit einem grün fluoreszierenden Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin. Die Zellkerne sind ausgespart.

Aktinfilamente findet man bevorzugt in zwei Arealen der Zellen: zum einen direkt unterhalb der Plasmamembran in Form eines Aktinrings („dense peripheral band“), und zum anderen Aktinfasern welche eher zentral verlaufen („stress fibers“) (165). Der Aktinring ist mit vielen membrannahen Proteinen verlinkt, wie z.B. Proteinen der Tight Junctions, Proteinen der Adherens Junctions und fokalen Adhäsionsproteinen wie Paxillin, Vinkulin und FAK (Focal Adhesion Kinase) (siehe unten).

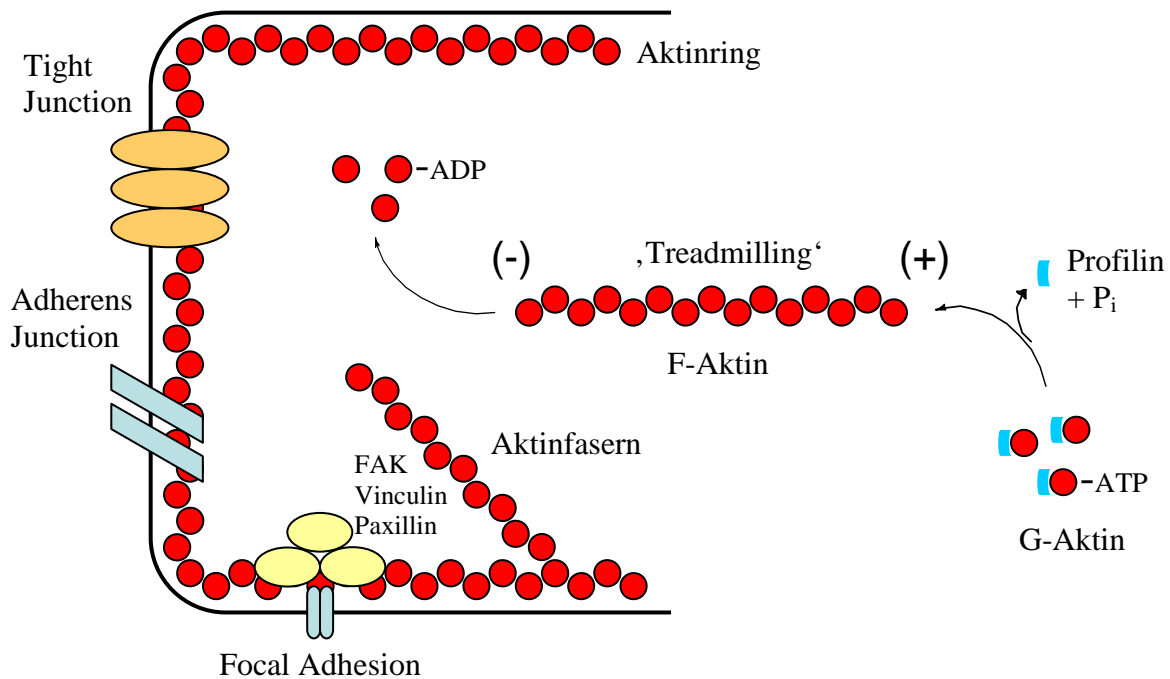
Dies ist aber nur eine sehr stark vereinfachte Anschauung. Tatsächlich ist das Aktin-Cytoskelett eine dynamische Struktur, die unter der Kontrolle vieler verschiedener Proteine organisiert wird, wie z.B. Cofilin, Profilin, Gelsolin, Thymosin und CapZ (106).

*Profilin* ist ein niedermolekulares Protein, welches nur an G-Aktin bindet. Profilin-gebundenes G-Aktin stellt die Hauptquelle monomeren Aktins für die Polymerisation dar. Profilin katalysiert den Austausch von ADP zu ATP an Aktin und bereitet damit die Polymerisation durch eine Anlagerung an das Plusende vor (106).

*Gelsolin* kann Aktinfilamente durchtrennen, sich an das Plusende des Restfilaments binden, und somit eine weitere Anlagerung von G-Aktin unterbinden. Es gehört damit wie CapZ zu

den so genannten Capping-Proteinen (84).

*Thymosin* bindet an Aktinmonomere, verhindert so eine Anlagerung an Aktinfilamente und ist damit der Gegenspieler des Profilins. Dadurch kann es in der Zelle zu einer deutlich erhöhten G-Aktin-Konzentration kommen. Darüber wie diese aktinbindenden Proteine selbst reguliert werden, ist bis heute relativ wenig bekannt (36).

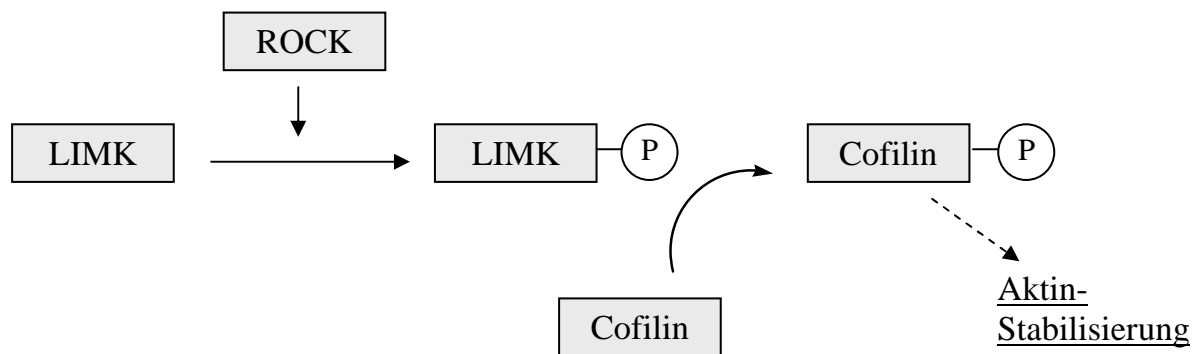


**Abb. 6: Schematische Darstellung des endothelialen Aktin-Cytoskeletts.**

Aktinfilamente findet man bevorzugt in zwei Arealen der Zellen: zum einen direkt unterhalb der Plasmamembran in Form eines Aktinrings („dense peripheral band“), und zum anderen Aktinfasern welche eher zentral verlaufen („stress fibers“). Der Aktinring ist mit vielen membrannahen Proteinen verlinkt. Aktin unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau (Treadmilling). Einzelheiten siehe Text.

*Cofilin* ist ein niedermolekulares Protein das sowohl an monomeres G-Aktin als auch an polymeres F-Aktin bindet. Bindet Cofilin an F-Aktin, führt es zu einer erhöhten Depolymerisationsrate am Minusende des Aktinstranges. Des Weiteren ist Cofilin am Recycling der Aktinmonomere beteiligt. Die Cofilin-Aktivität wird über den Phosphorylierungsstatus gesteuert. Eine Cofilin-Phosphorylierung führt dazu, dass Cofilin nicht mehr an Aktin bindet, und damit zu einer Aktin-Stabilisierung. Diese Phosphorylierung wird wiederum durch LIM-Kinase (LIMK) reguliert, welche durch Rho-Kinase (ROCK) aktiviert wird (30,104,107,108,146) (Abb. 7).





**Abb. 7: Aktin-Stabilisierung durch Cofilin-Phosphorylierung.**

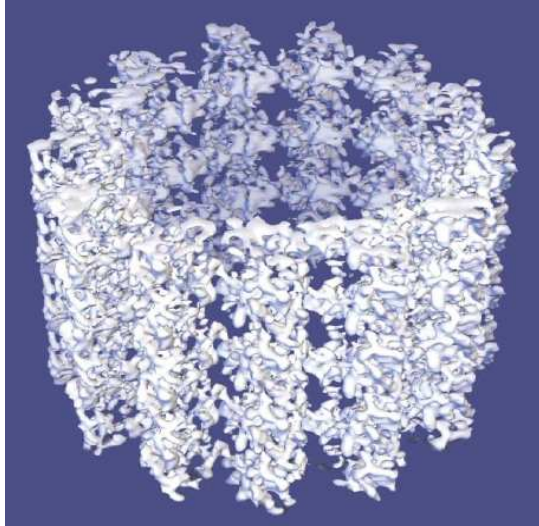
Eine Cofilin-Phosphorylierung führt dazu, dass Cofilin nicht mehr an Aktin bindet, und damit zu einer Aktin-Stabilisierung. Diese Phosphorylierung wird durch LIM-Kinase (LIMK) reguliert, welche wiederum durch Rho-Kinase (ROCK) aktiviert wird.

Aktin bildet außerdem in Kombination mit Myosin den kontraktilen Apparat der Endothelzellen, ähnlich wie in glatten Muskelzellen. Eine Kontraktion beruht auf der Interaktion zwischen Aktin und Myosin in einer Sarkomer-ähnlichen Struktur. Regulatorisch wirkt hierbei einerseits eine Phosphorylierung von MLC (Myosin Light Chain) durch MLCK (Myosin Light Chain Kinase) und andererseits eine Dephosphorylierung durch MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). MLCK sorgt damit für eine gesteigerte Kontraktion und MLCP für eine Relaxation der Zelle.

## Mikrotubuli

Der zweite wichtige Cytoskelettbestandteil sind die Mikrotubuli (24). Sie sind auch aus globulären Untereinheiten, dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (die zusammen ein Dimer ergeben) zusammengesetzte Polymere, die röhrenförmige Filamente bilden (Abb. 8). Die Mikrotubuli unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Dabei werden die Tubulin-Dimere mit zwei gebundenen GTP-Molekülen an das Filament angelagert, wobei das GTP der  $\beta$ -Untereinheit zu GDP hydrolysiert werden kann. Geschieht dies aufgrund einer anderen Kinetik nicht, besitzen die Mikrotubuli eine GTP-Kappe, was zu einer erhöhten Stabilität führt. Der Auf-

und Abbau der Mikrotubuli wird damit hauptsächlich durch die Konzentration an freien GTP-Tubulin-Dimeren (hohe Konz. = Aufbau, niedrige Konz. = Abbau) und die GTPase-Aktivität der  $\beta$ -Untereinheit kontrolliert.



**Abb. 8: Mikrotubuli.**

Darstellung der Struktur der Mikrotubuli. Rekonstruktion einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Huilin Li et al. 2002).

### **Intermediärfilamente**

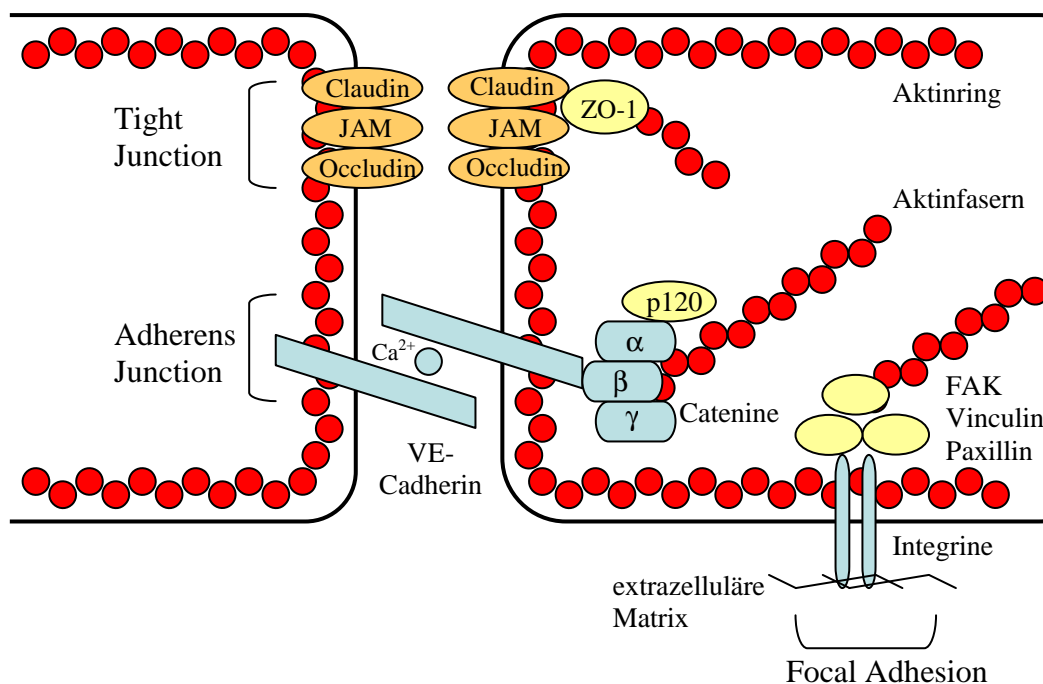
Die Intermediärfilamente repräsentieren die dritte Gruppe der Cytoskelett-Elemente. Sie sind im Gegensatz zu Aktin und den Mikrotubuli nicht aus globulären Untereinheiten aufgebaut und ihre Polymerisierung benötigt keine Energie. Sie besitzen eher statische Aufgaben und sind an der Verknüpfung der einzelnen Zellen zum Gewebe beteiligt. Die Proteine der Intermediärfilamente werden sehr zellspezifisch exprimiert. Hierbei spielt die Unterklasse der Vimentin-artigen Filamente die wichtigste Rolle in Endothelzellen. Vimentinfilamente haben ihren Ursprung häufig in der Kernmembran (Verankerung des Zellkerns) sowie in den Adhäsionsplaques der Plasmamembran. Für die endotheliale Schrankenfunktion scheint die Gruppe der Intermediärfilamente jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (38) .

### **Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen**

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sind der zweite Schlüssel für eine intakte Schrankenfunktion (6,7,59,134,154,161,167). Verantwortlich hierfür zeigen sich die ‚Adherens Junctions‘, die ‚Tight Junctions‘ und die ‚Focal Adhesion‘. Sie sind alle mit dem

Aktin-Cytoskelett verlinkt und sorgen so nicht nur für mechanische Stabilität, sondern bilden auch einen Signalübertragungsweg ins Zellinnere (Abb. 9).

Die *Adherens Junctions* werden über das transmembranäre Protein Cadherin gebildet (VE (Vascular Endothelial)-Cadherin bei Endothelzellen). Dabei bindet die extrazelluläre Domäne calciumabhängig an ein VE-Cadherin einer benachbarten Endothelzelle. Intrazellulär ist VE-Cadherin über die ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) Catenine mit dem Aktin-Cytoskelett verknüpft. Ein weiteres intrazelluläres Protein der Adherens Junctions ist p120, welches ein Angriffspunkt für diverse Kinasen und Phosphatasen darstellt (93). Die Stabilität der Adherens Junctions wird vor allem durch die extrazelluläre Calciumkonzentration und den Phosphorylierungsstatus der Cadherine und Catenine bestimmt (159).



**Abb. 9: Schematische Darstellung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen.**

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sind ein Schlüssel für eine intakte Schrankenfunktion. Verantwortlich hierfür zeigen sich die ‚Adherens Junctions‘, die ‚Tight Junctions‘ und die ‚Focal Adhesion‘. Sie sind aus einer großen Anzahl verschiedener Transmembranproteine aufgebaut und sind mit dem Aktin-Cytoskelett verlinkt. Einzelheiten siehe Text (Darstellung in Anlehnung an Garcia et al. 2009).

Die *Tight Junctions* bestehen ebenfalls aus verschiedenen Transmembran-Proteinen – Occludin, Claudin und JAM (Junction Adhesion Molecule). Diese sind intrazellulär mit

Proteinen der ZO (Zona Occludens)-Familie assoziiert, welche wiederum eine Verknüpfung mit dem Aktin-Cytoskelett herstellen.

Als dritter Teil sind die Zell-Matrix-Verbindungen (*Focal Adhesions*) von großer Bedeutung für die endotheliale Schrankenfunktion. Die Focal Adhesions werden aus Integrinen (integrale Membranproteine) aufgebaut, die das Cytoskelett über cytosolische Proteine mit der extrazellulären Matrix (Collagen, Fibronectin, etc.) verbinden. Zu diesen cytosolischen Proteinen gehören  $\alpha$ -Aktinin, Vinkulin, Talin, FAK und Paxillin. Die Focal Adhesions erzeugen nicht nur eine zusätzliche Stabilität, sondern sind auch für die Signaltransduktion vom Aktin-Cytoskelett zur extrazellulären Matrix, welche mitbestimmend für die Zelladhäsion ist, und umgekehrt verantwortlich.

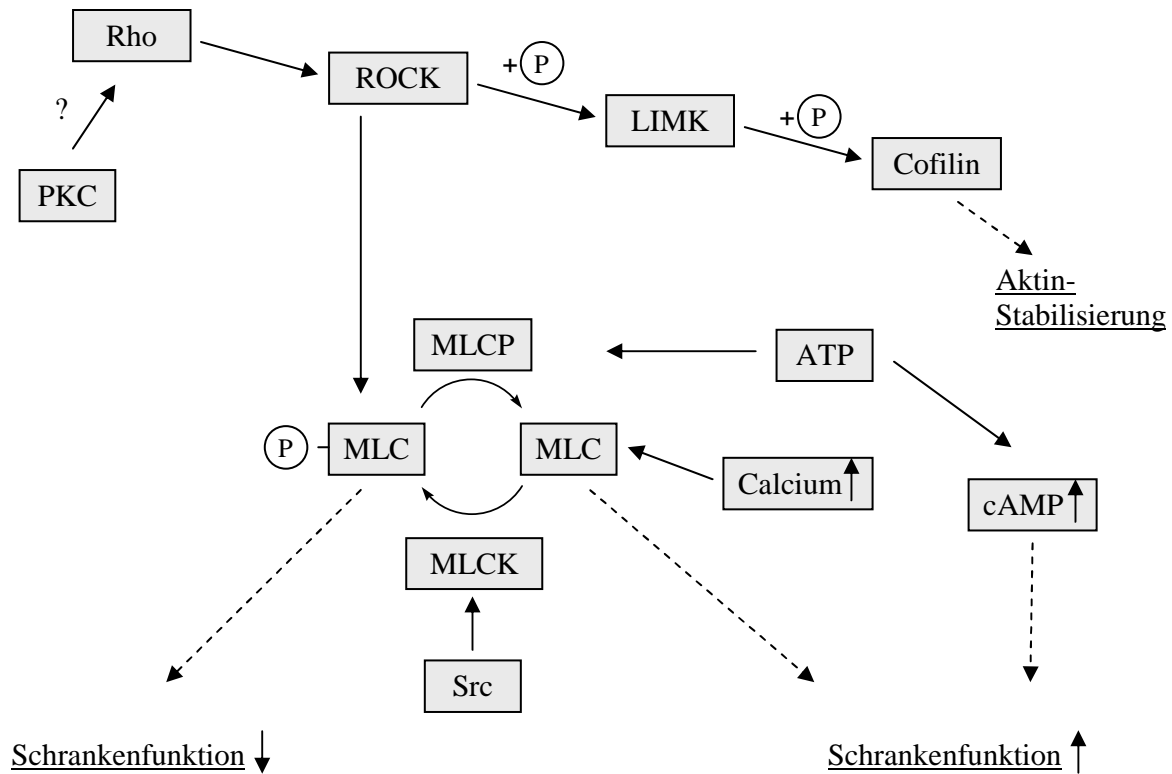
#### **1.4.2. Mechanismen einer endothelialen Permeabilitätserrhöhung**

Viele Studien haben gezeigt, dass eine Aktivierung des kontraktiven Apparates in verschiedenen Modellen der endothelialen Dysfunktion eine wichtige Rolle spielt. Ein Beispiel für ein gut untersuchtes Modell ist der Thrombin-induzierte Verlust der endothelialen Schrankenfunktion (38). So wurde beschrieben, dass Thrombin *in vitro* eine erhöhte Durchlässigkeit für Albumin hervorruft und dass eine Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts und eine Aktomyosin-abhängige Kraftentwicklung damit einhergehen (46,135). Eine Schlüsselfunktion bei der Kontraktion von Endothelzellen scheint die Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin (MLC), katalysiert durch die MLCK, einzunehmen (91,168). Eine Thrombin-induzierte endotheliale Hyperpermeabilität kann durch den Einsatz von MLCK-Inhibitoren gehemmt werden (Abb. 10) (46,158).

MLCK wiederum unterliegt auch einem komplexen Regulationsmechanismus. MLCK besitzt multiple Bereiche für Protein-Protein-Wechselwirkungen, sowie Bereiche, welche über Tyrosinphosphorylierung reguliert werden (10). Dieser Phosphorylierungsstatus scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der endothelialen Schrankenfunktion zu spielen, wie am Beispiel des Diperoxovanadat-induzierten Verlustes der Schrankenfunktion gezeigt wurde (45). Eine über Src induzierte Phosphorylierung von Tyrosin führte hier zu einer erhöhten Endothelzellkontraktion.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Familie der kleinen Rho-GTPasen in verschiedenen Modellen der endothelialen Dysfunktion eine wichtige Rolle spielt. Sie sind in die

Signaltransduktion zum Aktin-Cytoskelett verwickelt und eine Aktivierung von Rho kann über Rho-Kinase zu einer Phosphorylierung von MLC, der Bildung von Aktin-Stressfasern und einer gestörten Schrankenfunktion führen (10,15,91).



**Abb. 10: Regulation der endothelialen Schrankenfunktion.**

Zusammenfassung diskutierter Mechanismen zur Regulation der endothelialen Schrankenfunktion (Bamburg et al., Linseemann et al., Gorovoy et al., Bindewald et al., Borbiev et al.). Verwendete Abkürzungen: ATP – Adenosintriphosphat, cAMP – Cyclisches Adenosinmonophosphat, LIMK – LIM-Kinase, MLC – Myosin Light Chain, MLCK – Myosin Light Chain Kinase, MLCP – Myosin Light Chain Phosphatase, PKC – Proteinkinase C, ROCK – Rho-Kinase, Src – Tyrosinkinase Src. Einzelheiten siehe Text.

Neben MLCK und Rho werden noch Beteiligungen vieler weiterer Mechanismen an der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion diskutiert (38). Sowohl für Proteinkinase C (PKC) und Src als auch für verschiedene MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinases) konnte eine Beteiligung an der Endothelzell-Kontraktion gezeigt werden (14,18,20,61,137). Die genauen Signalübertragungswege werden aber noch kontrovers diskutiert.

Das Second-Messenger-Molekül cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ebenfalls an der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion beteiligt. Es wurde gezeigt, dass eine

Erhöhung des intrazellulären cAMP *in vitro* die Permeabilität von makrovaskulären Endothelzellen verringern kann (9,139).

Extrazelluläres ATP kann über eine MLC-Dephosphorylierung ebenfalls zu einer erhöhten endothelialen Schrankenfunktion beitragen (54,55,58). Dieser Effekt kann einerseits auf einer Aktivierung von Myosin-Phosphatasen beruhen, andererseits auf einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (99).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Interaktion zwischen dem Aktin-Cytoskelett und den junctionalen Proteinen direkt an der Regulation der Schrankenfunktion beteiligt ist. Während ein peripherer Aktinring die Junctions stabilisiert, sollen Stressfasern zu einer Destabilisation führen (159). Da die Stabilität der Adherens Junctions, also einer interzellulären Bindung über VE-Cadherin, calciumabhängig ist, spielt die extrazelluläre Calcium-Konzentration eine wichtige Rolle. Aber nicht nur der extrazellulären, sondern auch Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurde eine zentrale Bedeutung in der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion unter anderem über MLC zugeschrieben (158). Des Weiteren wird die Stabilität der Adherens Junctions über den Phosphorylierungsstatus der Cadherine und Catenine bestimmt. Ozawa et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung von kultivierten Endothelzellen mit Pervanadat, einem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor, zu einer Hyperphosphorylierung der Catenine und damit zu einer Dissoziation des  $\alpha$ -Catenin/VE-Cadherin-Komplexes führte (105). Auf der anderen Seite ist aber auch ein Grundlevel der Phosphorylierung von Nöten, um die Zell-Zell-Kontakte aufrecht zu erhalten, wie Versuche mit spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigten (40).

Über die Regulation der Tight Junctions ist weit weniger bekannt als bei den Adherens Junctions. Wie Kevil et al. gezeigt haben, können MAP-Kinasen hier eine Rolle spielen, denn sowohl eine VEGF- (Vascular Endothelial Growth Factor) als auch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Schranken-Dysfunktion konnte teilweise durch MAPK-Inhibitoren gehemmt werden (71,72). Auch die Aktivität der Proteinkinase C scheint von Bedeutung zu sein, aber die Schrankenfunktion wird teilweise gestärkt und teilweise geschwächt (6,7).

Die Focal Adhesions werden von den gleichen Signalwegen beeinflusst wie das Aktin-Cytoskelett. So führt eine Hemmung von Rho zu einer Dephosphorylierung von Paxillin und FAK und stützt damit die endotheliale Schrankenfunktion (26). Andersherum führt eine Src-induzierte Phosphorylierung zu einer Schwächung der Focal Adhesions (38).

## 2. Problemstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst mittels einer eisenabhängigen lysosomalen Fluoreszenzsonde (BDA) festgestellt werden, inwieweit es in der Kälte zu einem Anstieg des lysosomalen chelatisierbaren Eisens in primären Hepatozyten kommt und ob dieser zum nachgewiesenen Anstieg des cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools der Zelle beitragen kann. Zudem sollten in diesem Zusammenhang ergänzende Versuche zum Mechanismus der eisenunabhängigen, Cathepsin B-abhängigen Komponente der kälteinduzierten Zellschädigung in diesem Zelltyp durchgeführt werden, in welchen die lysosomale Integrität während und nach Kaltlagerung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie bestimmt werden sollte.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen der Kälte auf die endotheliale Schrankenfunktion und die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Dabei sollte insbesondere zwischen Prozessen im Rahmen der eisenabhängigen, irreversiblen Zellschädigung und eisenunabhängigen morphologischen Veränderungen der Endothelzellen diskriminiert werden. Hierzu sollten am Modell primärer Schweineaortenendothelzellen unter anderem die zugrunde liegenden Veränderungen des Cytoskeletts und ihr Zustandekommen analysiert und Möglichkeiten zur Vermeidung einer kälteinduzierten endothelialen Permeabilitätserrhöhung gefunden werden.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Auswirkungen der Kaltinkubation auf den lysosomalen chelatisierbaren Eisenpool des Hepatozyten**

##### **3.1.1. Der lysosomale chelatisierbare Eisenpool in der Wärme**

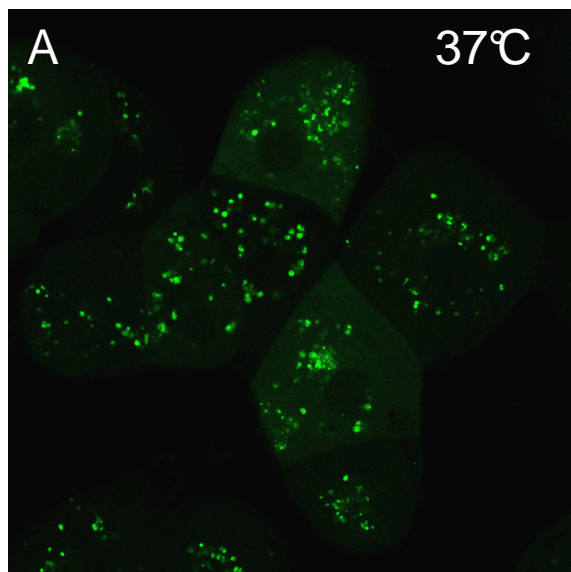
Nach Beladung der Hepatozyten mit der eisenabhängigen Fluoreszenzsonde BDA für 45 min bei 37°C und einer folgenden Nachinkubation für 15 min bei 37°C zeigte sich eine Akkumulation des Farbstoffes in den Lysosomen/Endosomen (Abb. 11 A). Anhand einer Kalibriergeraden konnte eine mittlere intralysosomale Konzentration des eisenfreien (fluoreszierenden) BDA von  $85 \pm 18 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Damit wurde von den Lysosomen/Endosomen eine genügend hohe Konzentration für eine quantitative Eisenbestimmung aufgenommen.

Die Zugabe des Eisenchelators Desferal (10 mM) konnte innerhalb von 120 min keinen Fluoreszenzanstieg induzieren (Abb. 11 B-E). Das bedeutet, dass BDA zuvor nicht gequencht vorlag, und es damit keinen Hinweis auf durch BDA chelatisierbare Eisenionen in der Wärme gab. Kontrollen mit einer experimentellen Erhöhung des Eisenpools durch die Zugabe des lipophilen Eisen (III)-bis-(8-Hydroxychinolin)-Komplexes hatten zuvor bestätigt, dass die intralysosomale Fluoreszenz von BDA effektiv gequencht werden kann, und dass diese Quenchung durch die Zugabe von Desferal reversibel ist (Springer, Knoop, Rauen, unveröffentlicht).

##### **3.1.2. Der lysosomale chelatisierbare Eisenpool in der Kälte**

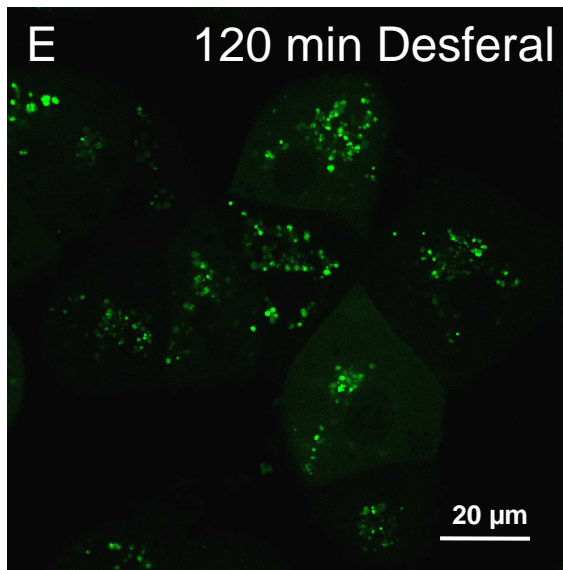
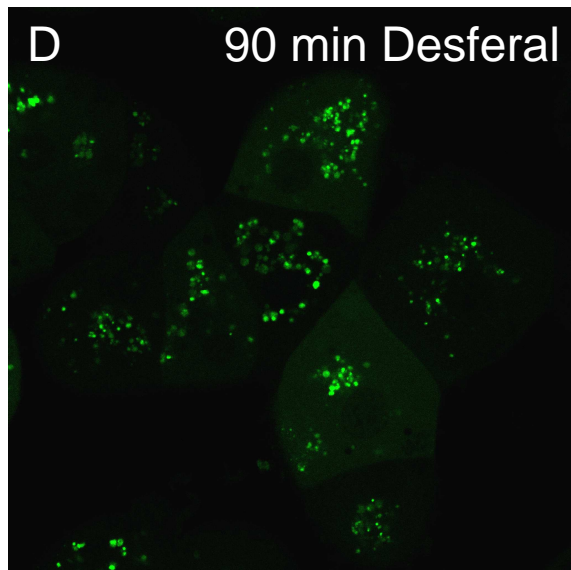
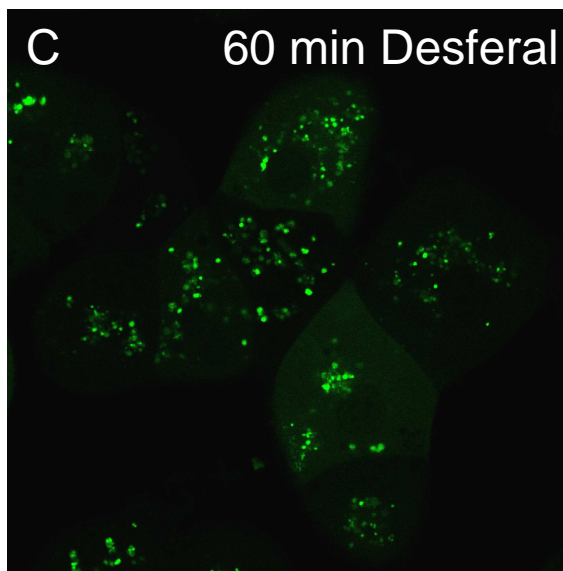
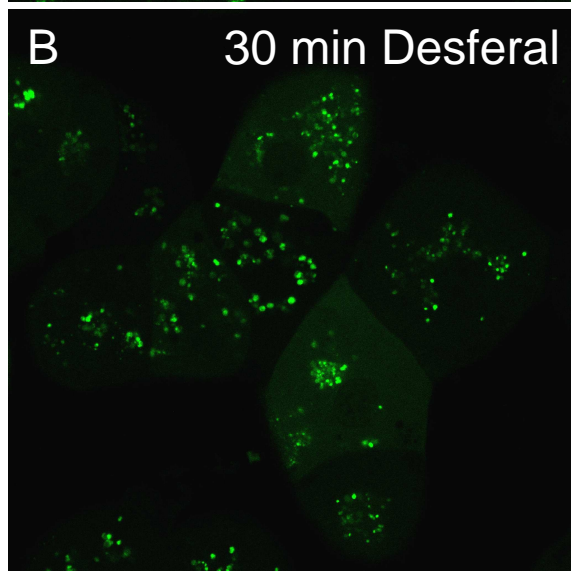
Nach Beladung der Hepatozyten mit der eisenabhängigen Fluoreszenzsonde BDA für 45 min bei 37°C und einer folgenden Kaltinkubation für 3 h bei 4°C konnte eine Lokalisation der Fluoreszenzsonde BDA in den Lysosomen/Endosomen beobachtet werden (Abb. 12 A). Die Zugabe des Eisenchelators Desferal (10 mM) bewirkte in den folgenden 120 min eine Zunahme der intralysosomalen BDA-Fluoreszenz (Abb. 12 B-E), gleichbedeutend mit einer vorherigen Quenchung des BDA durch lysosomales chelatisierbares Eisen. Aus dieser Fluoreszenzzunahme konnte eine mittlere Erhöhung der Konzentration freien BDAs um  $5,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$  und damit eine intralysosomale Konzentration von  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  an (durch BDA chelatisierbaren) Eisenionen ermittelt werden.

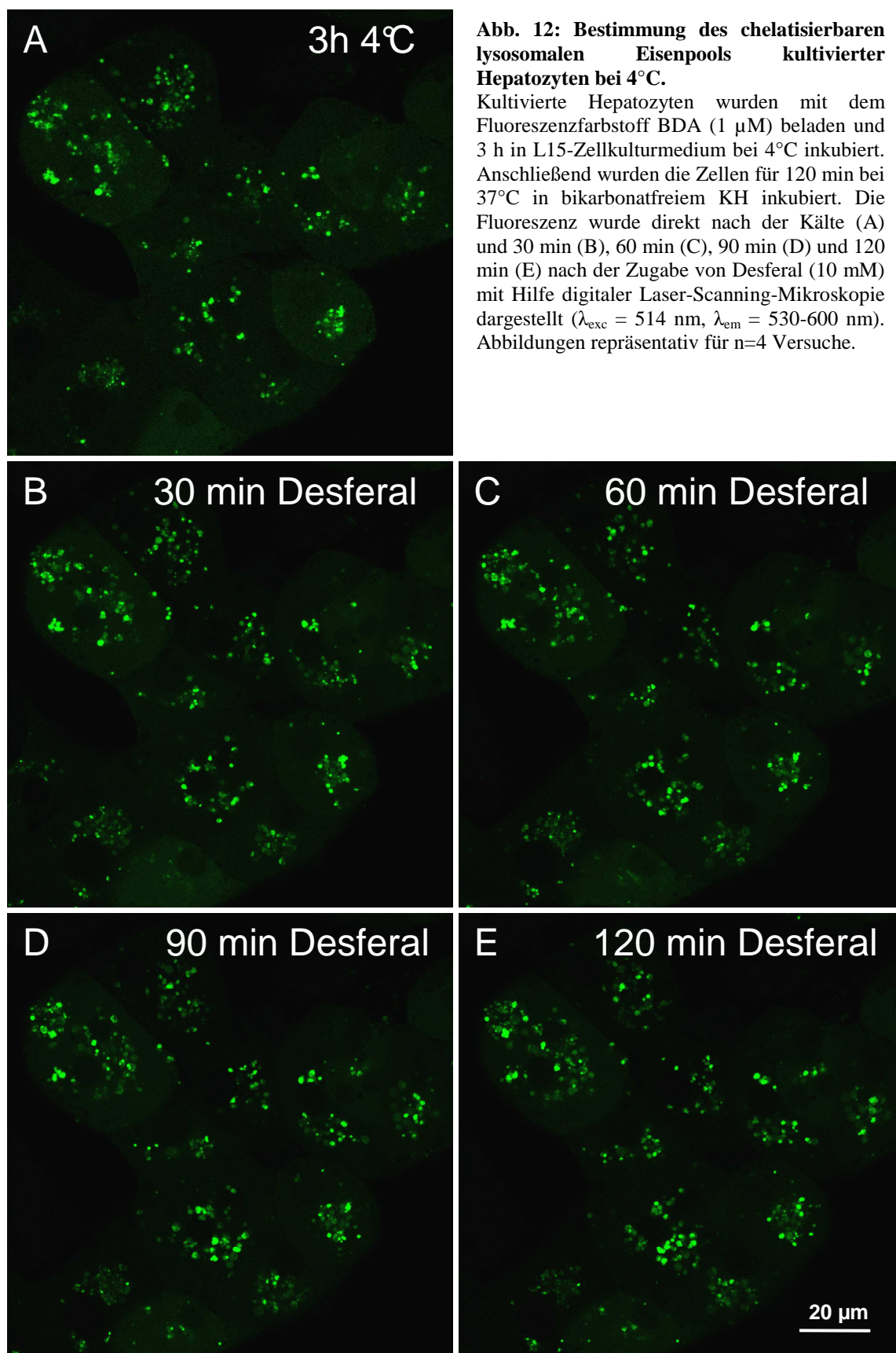




**Abb. 11: Bestimmung des chelatisierbaren lysosomalen Eisenpools kultivierter Hepatozyten bei 37°C.**

Kultivierte Hepatozyten wurden 45 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff BDA (1  $\mu$ M) beladen und anschließend für 120 min bei 37°C in bikarbonatfreiem KH inkubiert. Die Fluoreszenz wurde vor (A) und 30 min (B), 60 min (C), 90 min (D) und 120 min (E) nach der Zugabe von Desferal (10 mM) mit Hilfe digitaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt ( $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530\text{-}600 \text{ nm}$ ). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.





### **3.2. Lysosomale Schädigung während der Kaltinkubation des Hepatozyten**

#### **3.2.1. Kälteinduzierte lysosomale Permeabilisierung**

Die Integrität der Lysosomen wurde mit Hilfe des lysosomalen Fluoreszenzindikators LysoTracker Red untersucht. Dieser Farbstoff akkumuliert spezifisch in den sauren Organellen der Zelle solange die Membran dieser intakt und der pH sauer ( $\text{pH} < \text{pH}_{\text{Cytosol}}$ ) ist. Nach Beladung der Hepatozyten mit LysoTracker Red für 20 min bei 37°C zeigte sich eine Akkumulation des Farbstoffes in den Lysosomen/Endosomen (Abb. 13 A). Daneben war auch eine leichte cytosolische Akkumulation zu beobachten ( $\text{pH}_{\text{Cytosol}} < \text{pH}_{\text{extrazellulär}}$ ).

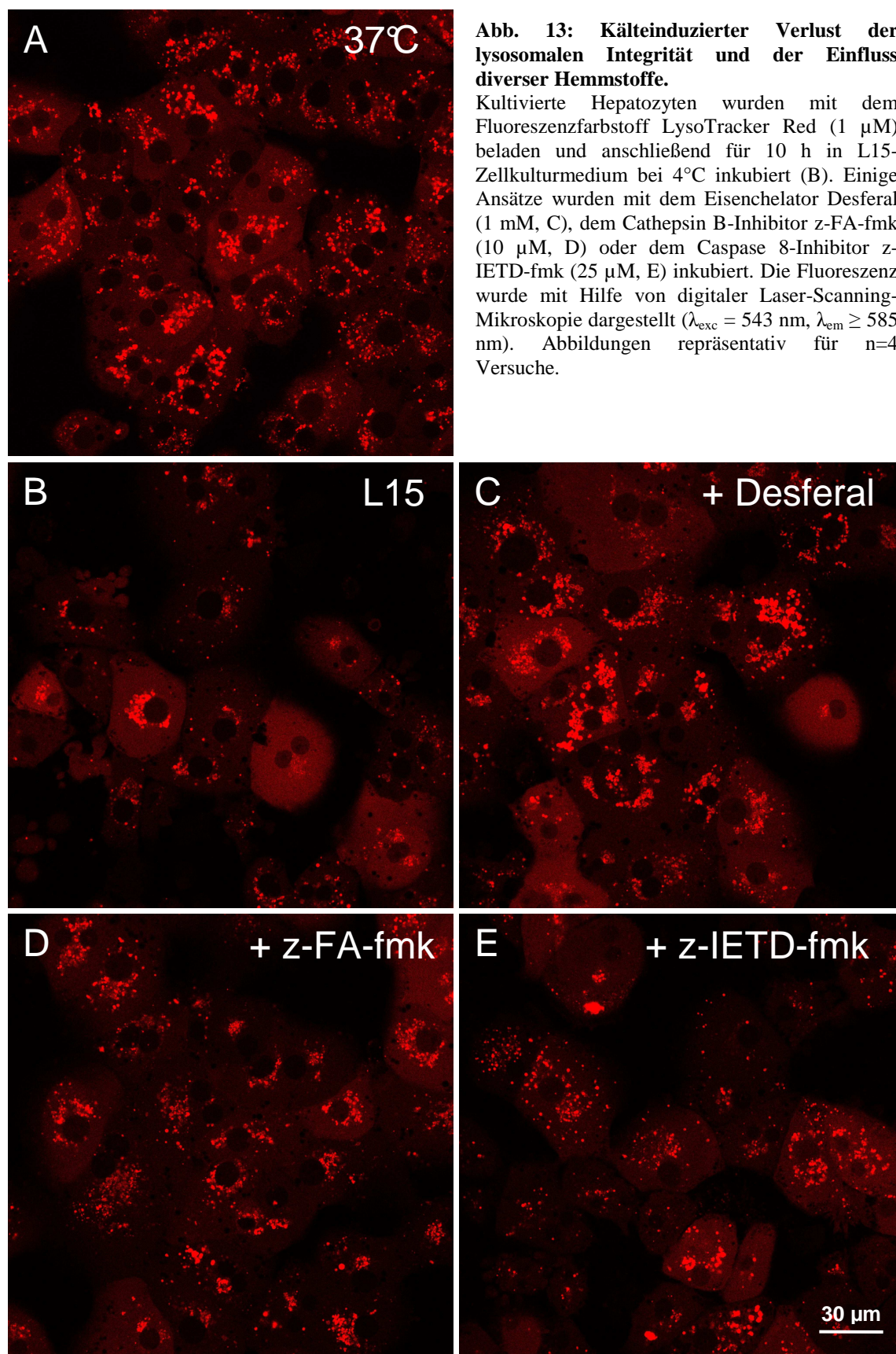
Bereits nach einer zehnstündigen Kaltinkubation (4°C) in L15-Zellkulturmedium war ein stark ausgeprägter Rückgang der Zahl intakter Lysosomen zu beobachten (Abb. 13 B). Wie der weitere Zeitverlauf zeigt, hatten nach 15 h Inkubation der Hepatozyten in L15-Zellkulturmedium bei 4°C nahezu alle und nach 18 bzw. 24 h alle Lysosomen ihre Integrität verloren (Abb. 14).

#### **3.2.2. Hemmung der kälteinduzierten lysosomalen Permeabilisierung durch einen Eisenchelator und einen Cathepsin B-Inhibitor**

Die Zugabe des Eisenchelators Desferal (1 mM) während einer 10-stündigen Kaltinkubation konnte den Verlust der lysosomalen Integrität zu einem großen Teil hemmen (Abb. 13 C). Auch der Cathepsin B-Inhibitor z-FA-fmk war in der Lage, diesen kälteinduzierten Verlust der lysosomalen Integrität zu vermindern (Abb. 13 D).

Auch nach 15 h Kaltinkubation zeigte der Eisenchelator Desferal noch einen partiellen Schutz der Lysosomen (Abb. 14). Da nach einer 15-stündigen Kaltinkubation die eisenabhängige Zellschädigung des Hepatozyten schon stark ausgeprägt war, und der Cathepsin B-Inhibitor z-FA-fmk allein keinen ausreichenden Schutz der Zellen (und damit auch der Lysosomen; Daten nicht gezeigt) gewährleisten konnte, wurde der Cathepsin B-Inhibitor nun in Kombination mit Desferal eingesetzt. Verglichen mit der Inkubation mit Desferal allein zeigte der Cathepsin B-Inhibitor nach 15 h Kaltinkubation einen additiven positiven Effekt auf die Lysosomenintegrität (Abb. 14). Nach einer 18-stündigen Kaltinkubation zeigten auch die Lysosomen der Zellen, die in Gegenwart des Eisenchelators Desferal inkubiert wurden, eine





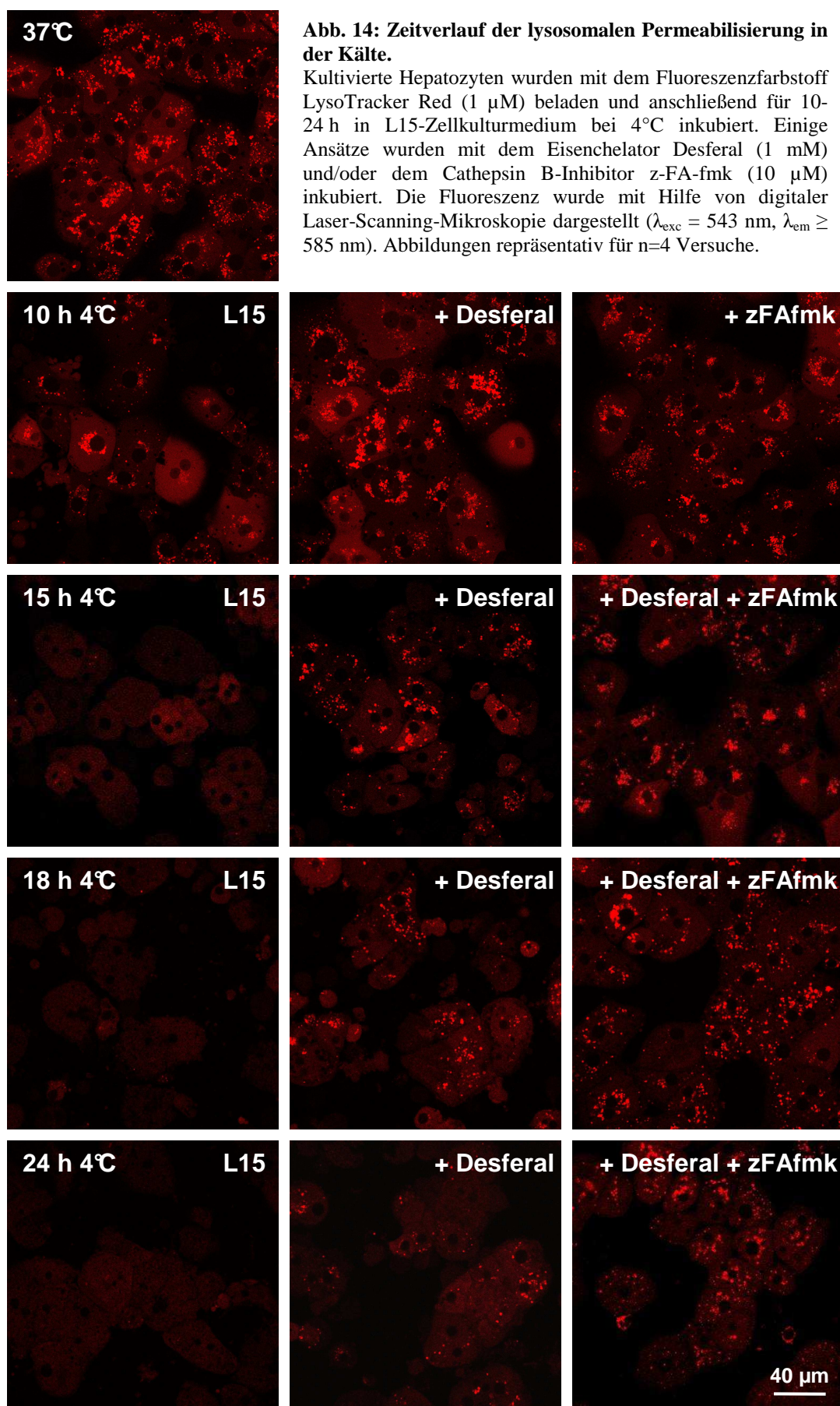
ausgeprägte Schädigung (Abb. 14). Die Kombination von Desferal und z-FA-fmk zeigte hingegen noch einen deutlichen Schutzeffekt. Auch nach 24 Stunden Kaltinkubation bewirkte die Kombination beider Substanzen noch einen nahezu vollständigen Schutz der lysosomalen Integrität, während die nur in Gegenwart von Desferal inkubierten Zellen einen nahezu vollständigen Verlust der lysosomalen Integrität aufwiesen (Abb. 14).

### **3.2.3. Untersuchungen zur Beteiligung von Caspase 8 an der lysosomalen Schädigung**

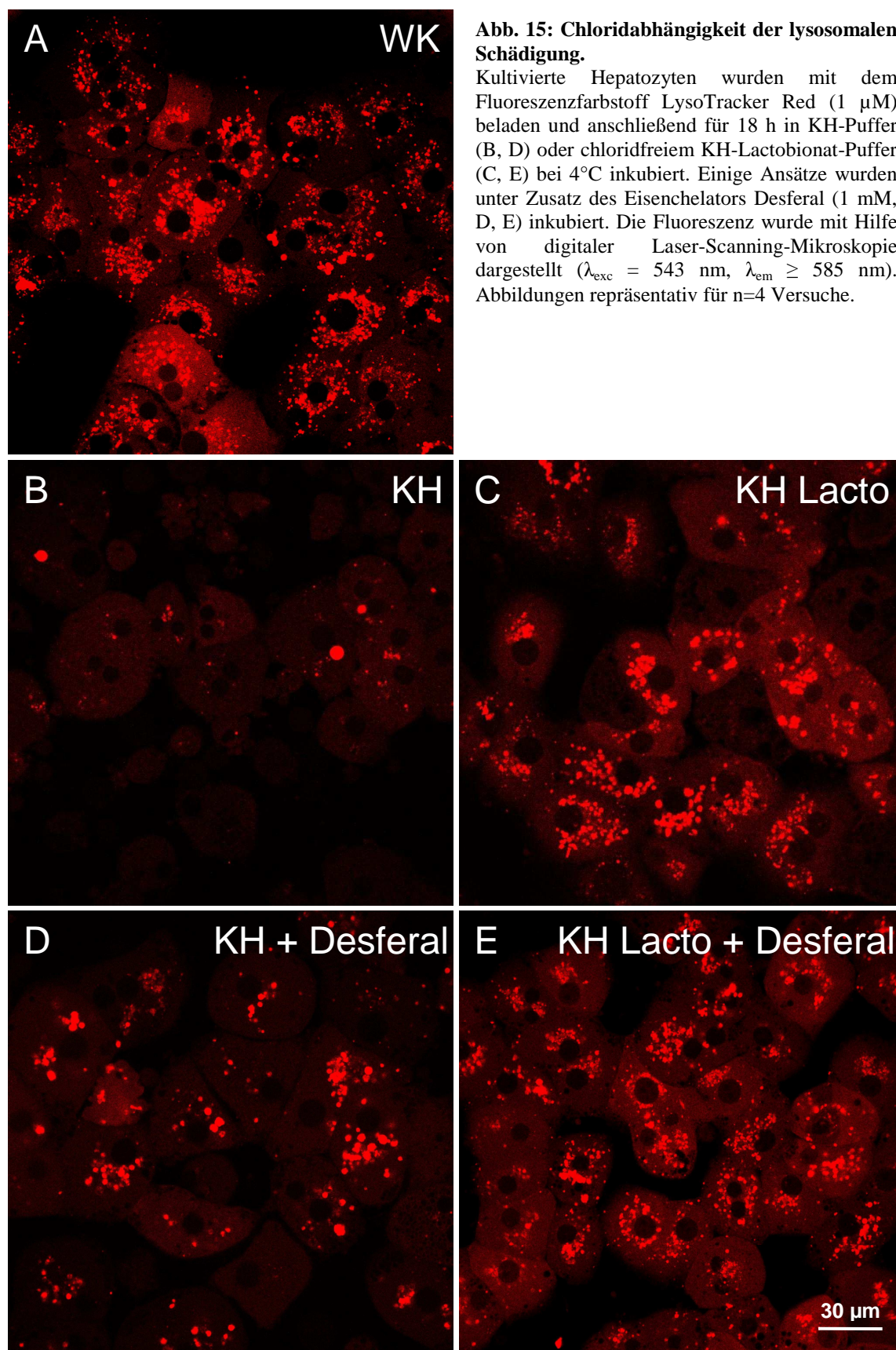
Neben den oben gezeigten Schutzeffekten durch den Eisenchelator Desferal (Abb. 13 C) und den Cathepsin B-Inhibitor z-FA-fmk (Abb. 13 D) konnte auch ein partieller Schutzeffekt durch den Caspase 8-Inhibitor z-IETD-fmk vor der kälteinduzierten Schädigung der Lysosomen gezeigt werden – ähnlich groß wie der Schutzeffekt durch z-FA-fmk (Abb. 13 E).

### **3.2.4. Chloridabhängigkeit der lysosomalen Schädigung in der Kälte**

Nach 18 Stunden Kaltinkubation in Krebs-Henseleit (KH)-Puffer zeigte sich ähnlich zur Inkubation in L15-Zellkulturmedium ein nahezu kompletter Verlust der lysosomalen Integrität (Abb. 15 B). Des Weiteren zeigte sich jedoch eine deutliche Chloridabhängigkeit der lysosomalen Schädigung. Wurde die Inkubation in dem modifizierten, nahezu chloridfreien KH-Lactobionat-Puffer durchgeführt, war ein deutlicher Schutz der Lysosomen zu beobachten (Abb. 15 C). Der Zusatz des Eisenchelators Desferal bewirkte sowohl in KH-Puffer (Abb. 15 D) als auch in KH-Lactobionat-Puffer (Abb. 15 E) einen zusätzlichen Schutzeffekt.



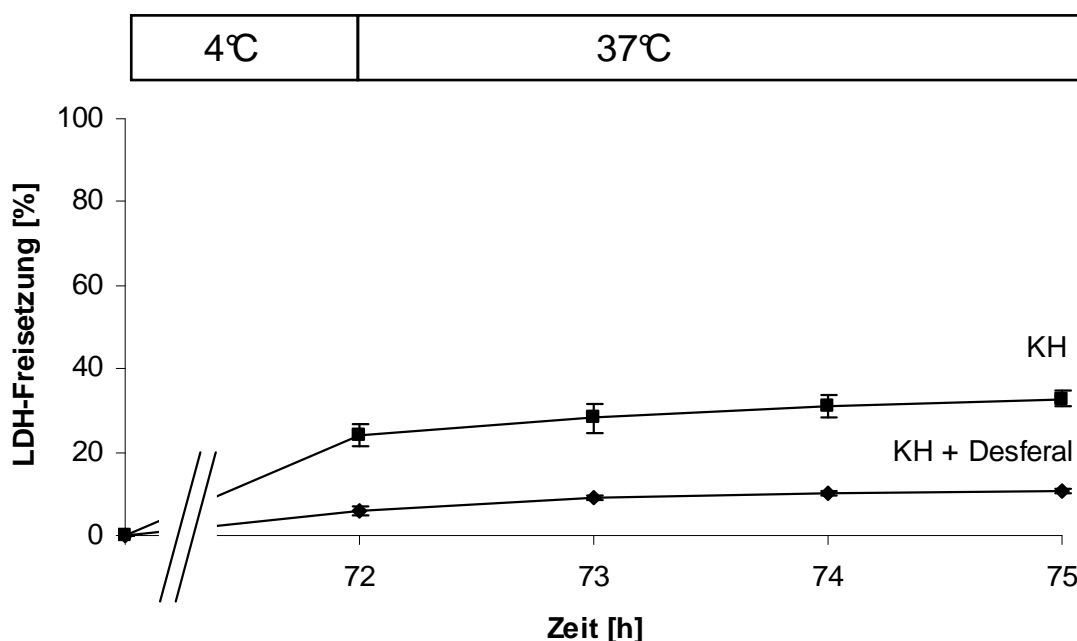




### 3.3. Kälteinduzierter Verlust der endothelialen Schrankenfunktion

#### 3.3.1. Kälteinduzierte Zellschädigung von Schweineaortenendothelzellen

Bei der Kaltlagerung (4°C) von Schweineaortenendothelzellen zeigte sich eine eisenabhängige Zellschädigung (Abb. 16). Nach einer Kaltinkubation für 72 h bei 4°C in Krebs-Henseleit (KH)-Puffer zeigte sich ein Vitalitätsverlust von nahezu 25 %, der sich während einer dreistündigen Wiedererwärmungsphase in M199-Zellkulturmedium nochmals leicht steigerte. Erfolgte die Kaltinkubation in Gegenwart des Eisenchelators Desferal (1 mM), konnte der Vitalitätsverlust nach Kaltinkubation und folgender Wiedererwärmung auf ca. 10 % verringert werden.



**Abb.16: Vitalitätsverlust von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden bei 4°C in Krebs-Henseleit-Puffer (KH) inkubiert und anschließend in M199-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt. Einigen Ansätzen wurde der Eisenchelator Desferal zugesetzt (1 mM). Der Vitalitätsverlust wurde über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase ermittelt. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD von 4 Versuchen.

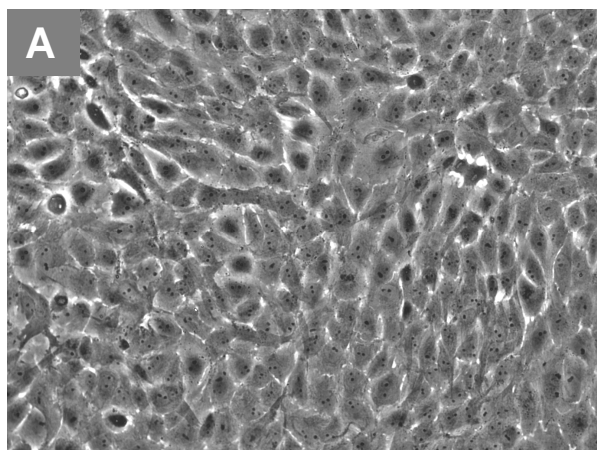


### **3.3.2. Kälteinduzierte morphologische Veränderungen an Schweineaorten-endothelzellen**

Neben dem Vitalitätsverlust konnten auch deutliche morphologische Veränderungen in der Kälte beobachtet werden. Endothelzellen bilden bei 37 °C einen dichten Monolayer (Abb. 17 A). Nach einer 72-stündigen Kaltinkubation (4°C) von Schweineaortenendothelzellen in KH-Puffer zeigte sich im Phasenkontrast ein starkes Zusammenziehen der Zellen und damit eine ausgeprägte Lückenbildung im endothelialen Monolayer (Abb. 17 B). Die interzellulären Lücken waren etwa so groß wie ein Zelldurchmesser und die Zellen waren untereinander nur noch an einigen wenigen Punkten durch lange Zellausläufer miteinander verbunden, die den Zellen ein „neuronenartiges“ Aussehen verliehen. Während einer dreistündigen Wiedererwärmungsphase in Zellkulturmedium bei 37°C waren diese morphologischen Veränderungen teilweise reversibel (Abb. 17 C). Viele Lücken wurden durch die sich wieder ausspreitenden Zellen wieder geschlossen, aber übereinstimmend mit den Vitalitätsdaten lösten sich auch zahlreiche Zellen von der Oberfläche ab und hinterließen so Lücken im endothelialen Monolayer.

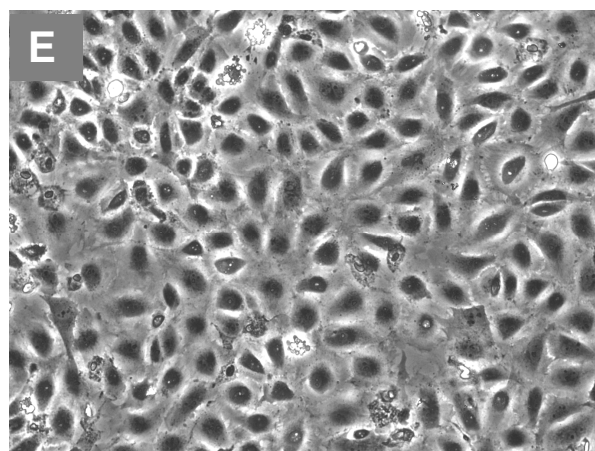
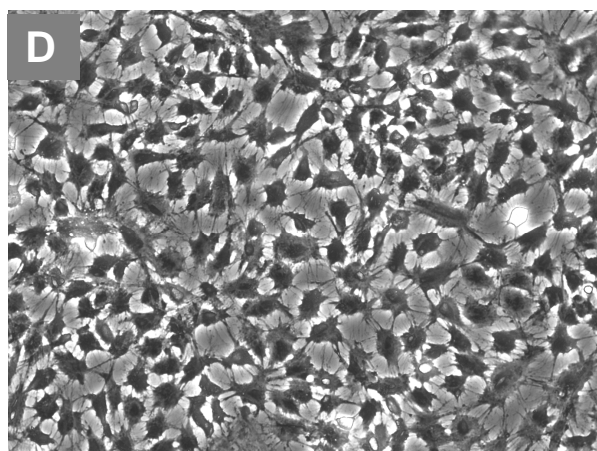
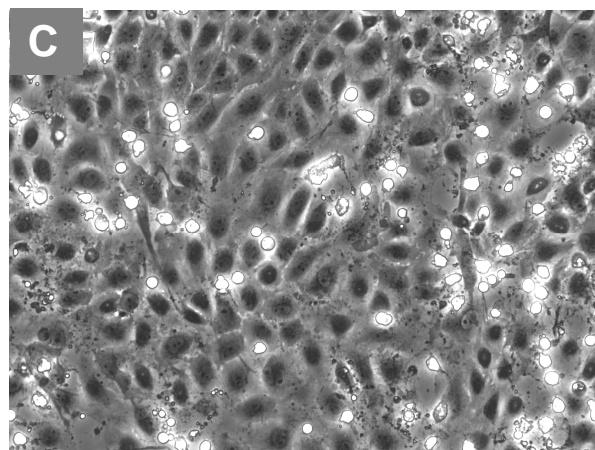
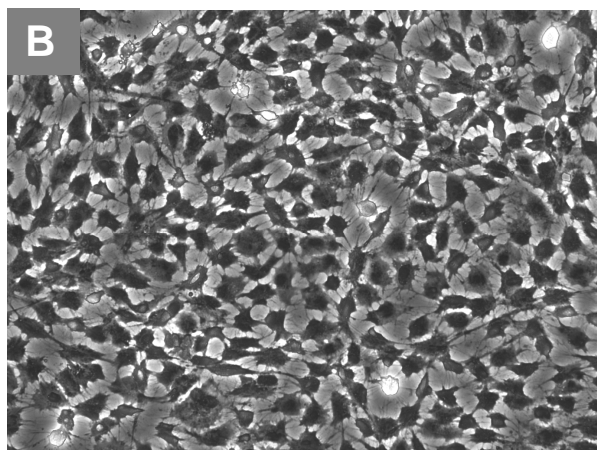
Wurden die Zellen durch die Zugabe des Eisenchelators Desferal (1 mM) vor der kälteinduzierten Zellschädigung geschützt, verhinderte dies nicht das Zusammenziehen der Zellen (Abb. 17 D) – wenn überhaupt wurde es verstärkt – aber nach der Wiedererwärmung bildeten die Zellen wieder einen kompletten Monolayer, vergleichbar mit der Wärmekontrolle (Abb. 17 E).

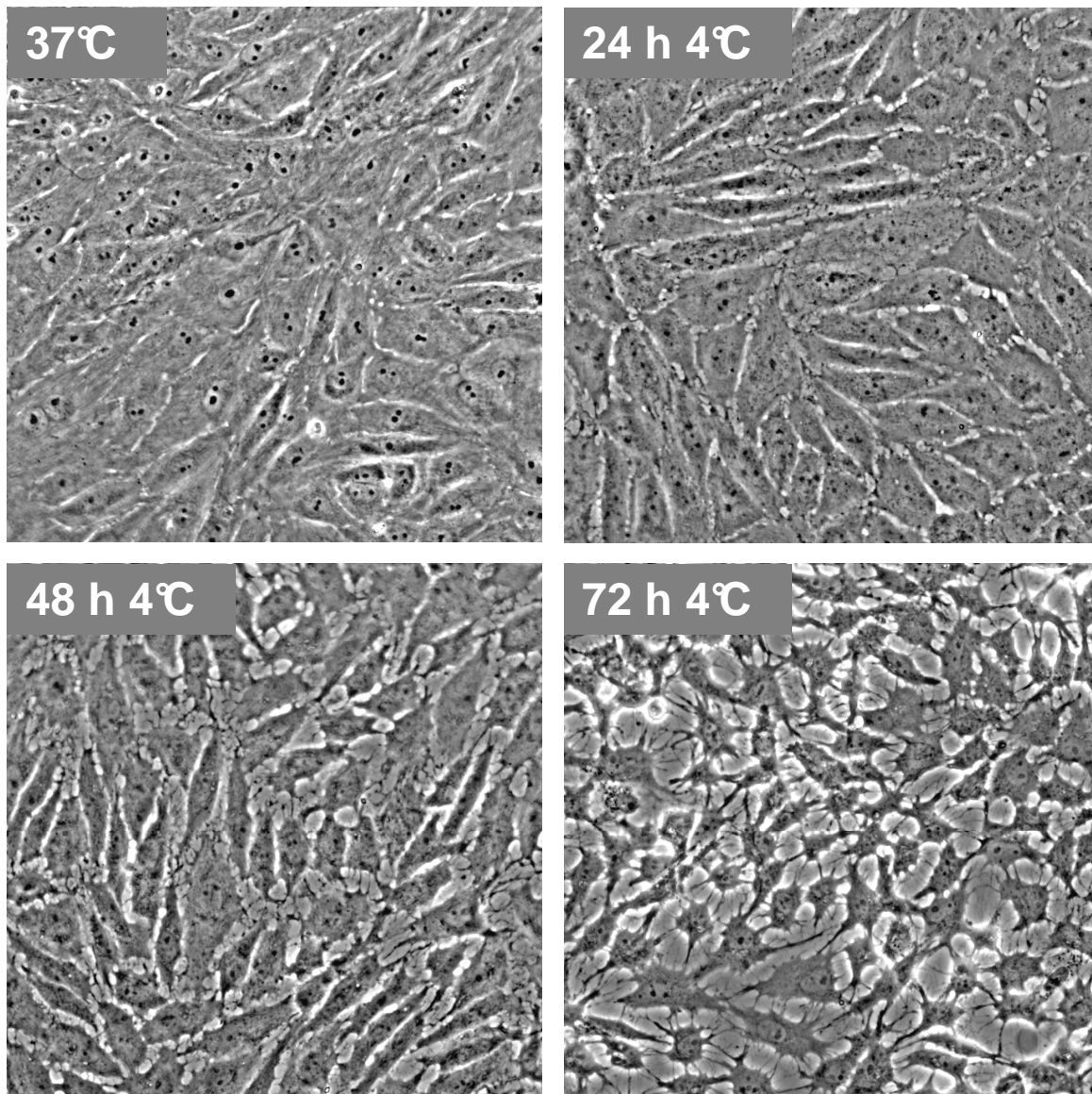
Bei der Kontraktion der Endothelzellen handelte es sich um ein zeitabhängiges Phänomen. Schon nach 24 h Inkubation in KH-Puffer + Desferal bei 4°C war eine leichte interzelluläre Lückenbildung im endothelialen Monolayer zu beobachten (Abb. 18). Diese Veränderungen waren nach 48 h noch deutlicher und erreichten nach 72 Stunden ihre starke oben beschriebene Ausprägung. Wurde die Kaltinkubationszeit über 72 Stunden erhöht, setzte trotz des Eisenchelators eine verstärkte Zellschädigung ein, und der Vorgang war nicht mehr vollständig reversibel (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden weitere mechanistische Untersuchungen bei einer Kaltinkubationszeit von 72 Stunden durchgeführt.



**Abb. 17: Morphologische Veränderungen von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer bei 4°C (B, D) inkubiert und anschließend für 3 h in M199-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt (C, E). Einigen Ansätzen wurde der Eisenchelator Desferal zugesetzt (1 mM; D, E). Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie vor der Kaltinkubation (A) sowie nach Kälte (B, D) und nach Wiedererwärmung (C, E) untersucht (Objektiv A Plan 20x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.





**Abb. 18: Zeitverlauf der morphologischen Veränderungen von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal.**

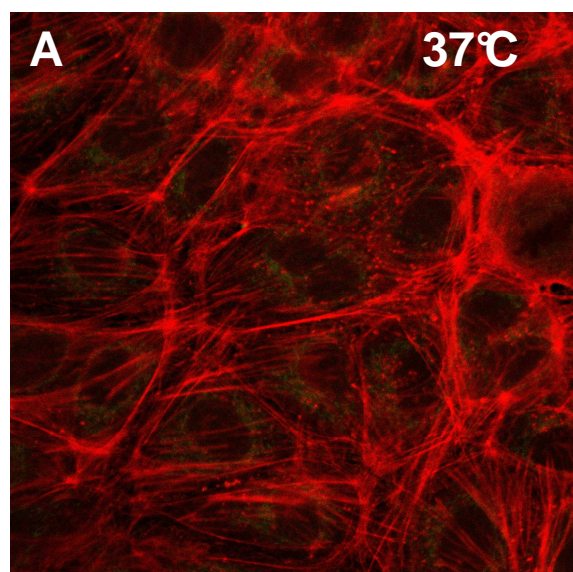
Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C inkubiert. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie vor der Kaltinkubation sowie nach Kälte untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

### **3.3.3. Veränderung des Aktin-Cytoskeletts während der Kaltinkubation und nachfolgender Wiedererwärmung**

Die ausgeprägten morphologischen Veränderungen legten eine Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts nahe. Die mit TRITC-Phalloidin für F-Aktin und Alexa Fluor DNase I für G-Aktin gefärbte Wärmekontrolle zeigte ein „normal“ ausgeprägtes Aktin-Cytoskelett mit langen Aktinfasern (rot), einem ausgeprägten peripheren Aktinring (rot) und niedrigem G-Aktin (grün; Abb. 19 A). Die Zellkerne sind ausgespart. Während der Kaltinkubation waren dann jedoch drastische Veränderungen zu beobachten. Nach 72 Stunden Kaltlagerung in KH-Puffer war nahezu das komplette F-Aktin-Cytoskelett zu G-Aktin abgebaut (Abb. 19 B). Die gleichen Veränderungen traten auch unter der Verwendung des Eisenchelators Desferal auf (Abb. 19 D). Während der Wiedererwärmung der in KH-Puffer kaltgelagerten Zellen in M199-Zellkulturmedium waren die kälteinduzierten Veränderungen nur partiell reversibel (Abb. 19 C). Es bildeten sich zwar teilweise neue Aktin-Fasern, aber eine Rückbildung des peripheren Aktinrings blieb aus. Fand die Kaltinkubation hingegen in Anwesenheit des Eisenchelators Desferal statt, waren nach einer dreistündigen Wiedererwärmung alle Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts komplett reversibel und es zeigte sich ein mit der Wärmekontrolle vergleichbares Aktin-Cytoskelett (Abb. 19 E). Um klar zwischen einer kälteinduzierten Zellschädigung und reversiblen Veränderungen der Morphologie und des Cytoskeletts unterscheiden zu können, wurden alle weiteren Experimente unter Zusatz von 1 mM Desferal durchgeführt.

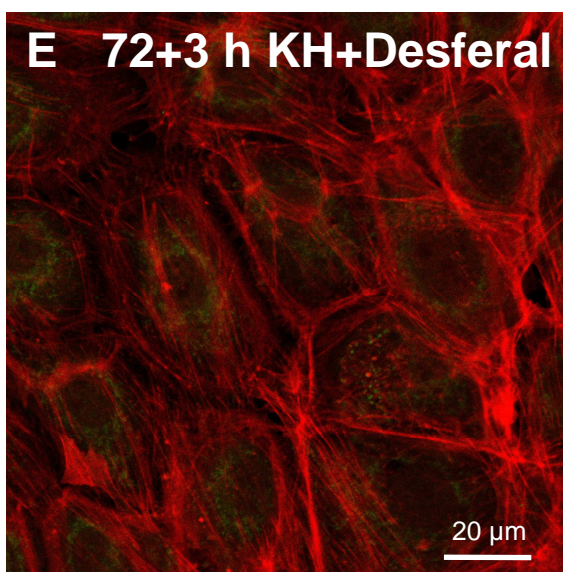
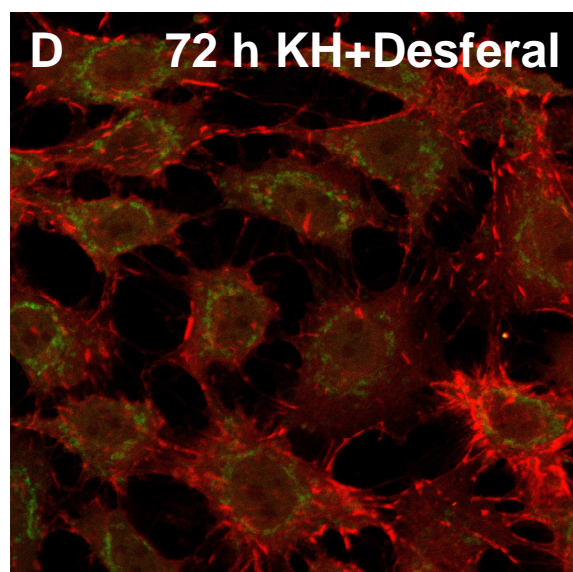
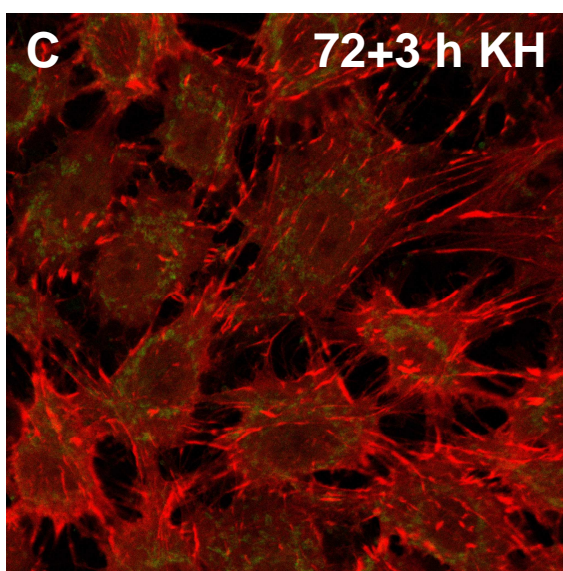
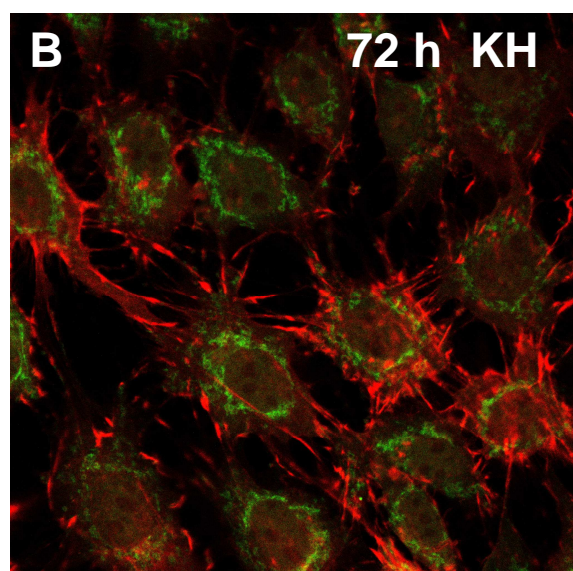
Im Zeitverlauf wurde nochmals die langsame, zeitabhängige Degradation des Aktin-Cytoskeletts deutlich. Schon nach einer Kaltlagerung für 24 Stunden bei 4°C in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal war eine deutliche Umverteilung von F-Aktin zu G-Aktin sichtbar, welche sich nach 48 Stunden noch verstärkte (Abb. 20). Die F-Aktin-Fasern zeigten sich stark fragmentiert und auch der periphere Aktinring verschwand. Nach 72 Stunden war ein nahezu kompletter Abbau von F-Aktin zu G-Aktin zu beobachten.



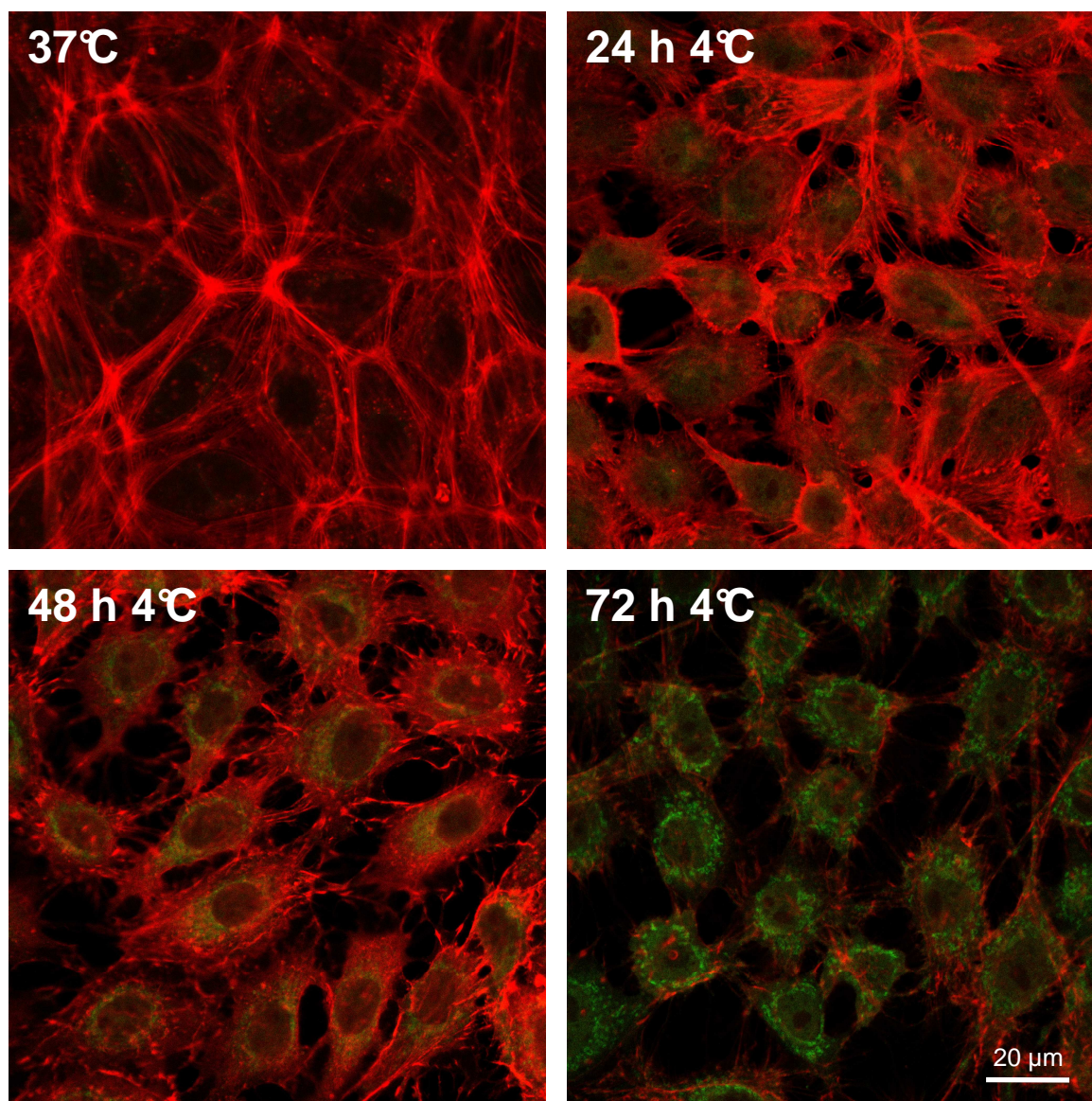


**Abb. 19: Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer bei 4°C (B, D) inkubiert und anschließend in M199-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt (C, E). Einigen Ansätzen wurde der Eisenchelator Desferal zugesetzt (1 mM; D, E). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.





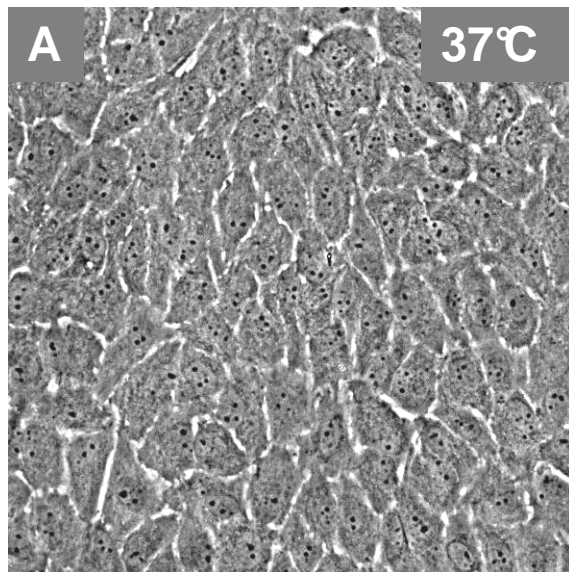


**Abb. 20: Zeitverlauf der Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNase I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

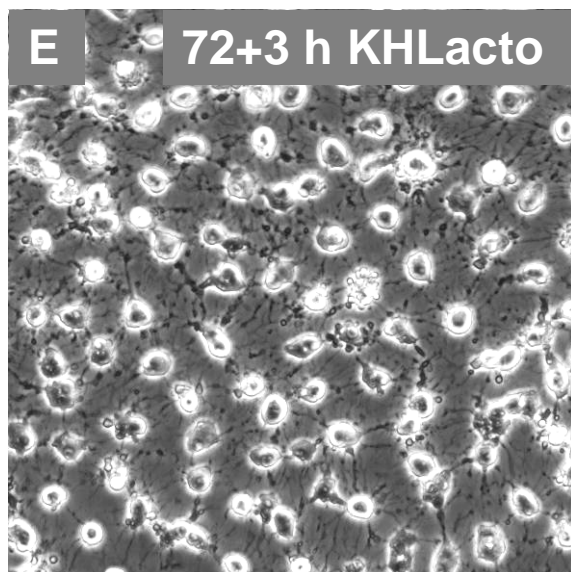
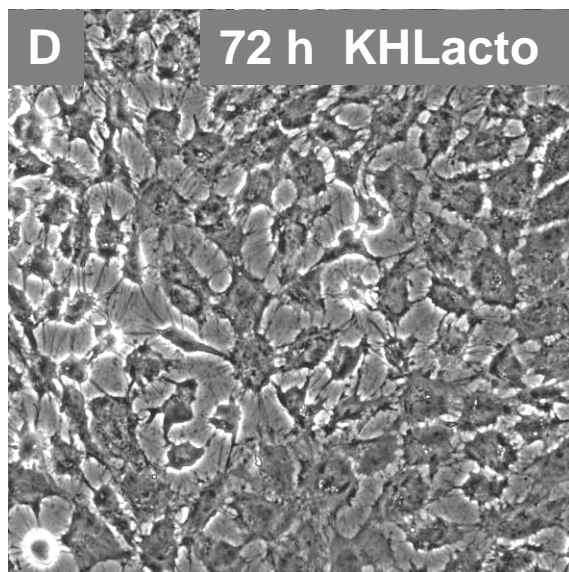
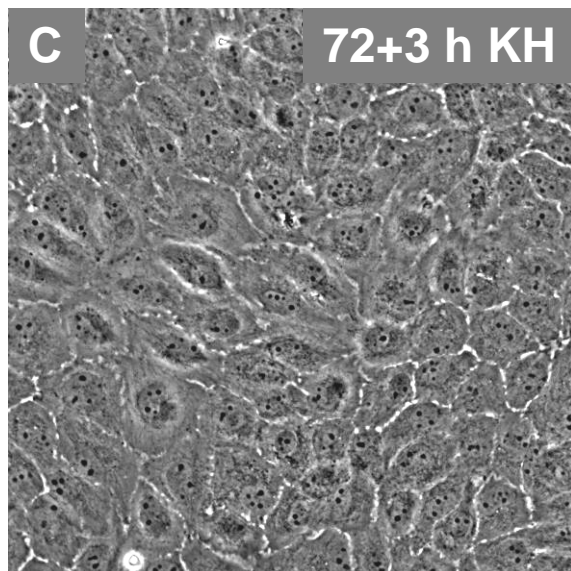
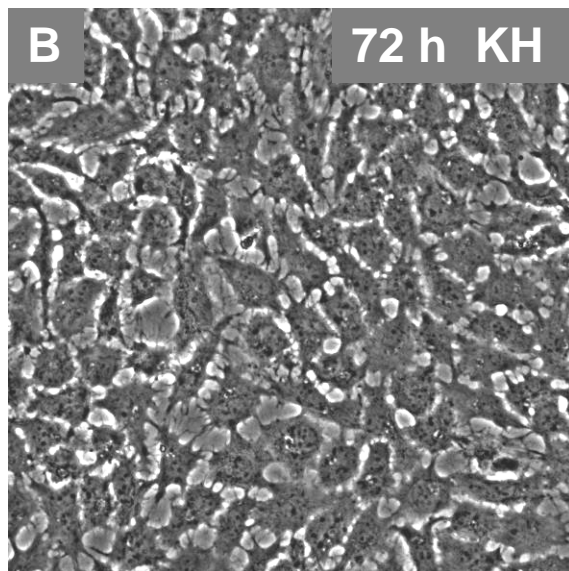
### **3.3.4. Auswirkungen einer chloridfreien Inkubation auf die kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie und des Aktin-Cytoskeletts**

Überraschenderweise waren die kälteinduzierten morphologischen Veränderungen (Abb. 21) und die Desintegration des Aktin-Cytoskeletts (Abb. 22) nicht mehr reversibel, wenn die Kaltinkubation in einem chloridfreien Medium stattfand. Nach 72 Stunden Kaltinkubation in dem nahezu chloridfreien KH-Lactobionat-Puffer mit Desferal (1 mM) zeigte sich zunächst ein ähnliches Bild wie in chloridhaltigem KH-Puffer (Abb. 21 D vs. B und Abb. 22 D vs. B). Die Zellen waren stark zusammengezogen (Abb. 21 B, D), es bildeten sich große Lücken im Monolayer, der Verlust der Aktinfasern und des peripheren Aktinrings waren zu beobachten und der G-Aktin-Level war erhöht (Abb. 22 B, D). In der Wiedererwärmungsphase spreiteten sich die chloridfrei inkubierten Zellen jedoch nicht wieder aus (Abb. 21 E), sondern kondensierten zu kleinen Kugeln und lösten sich von der Oberfläche. Das Aktin-Cytoskelett wurde vollständig zu G-Aktin abgebaut (Abb. 22 E). Erstaunlicherweise wurde zu diesem Zeitpunkt noch keine LDH von den Zellen freigesetzt. Erst nach einer Wiedererwärmungszeit von 5 Stunden war ein deutlicher Vitalitätsverlust der chloridfrei kaltinkubierten Zellen zu beobachten (Vitalitätsdaten nicht gezeigt).

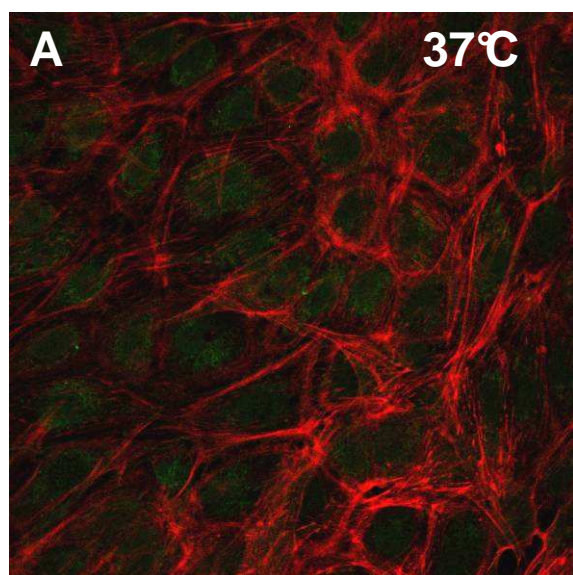


**Abb. 21: Chloridabhängigkeit der kälte-induzierten morphologischen Veränderungen von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in KH-Puffer (B) bzw. KH-Lactobionat-Puffer (D) mit 1 mM Desferal kaltinkubiert und anschließend für 3 Stunden in M199-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt (C, E). Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

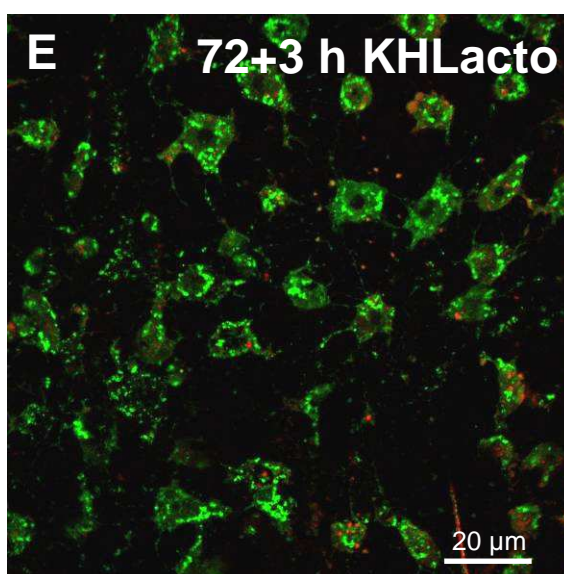
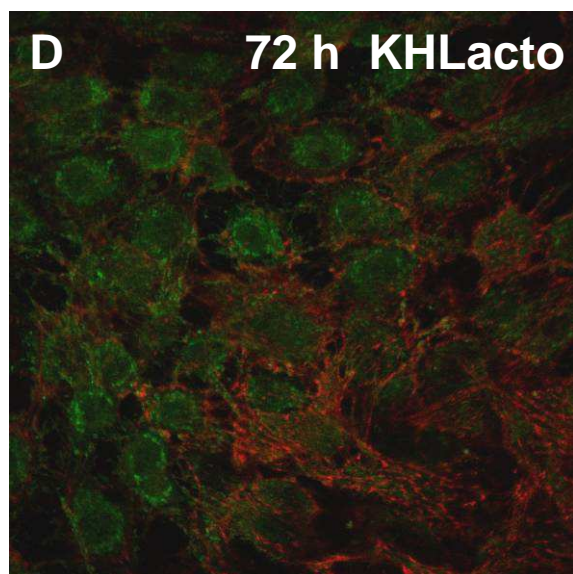
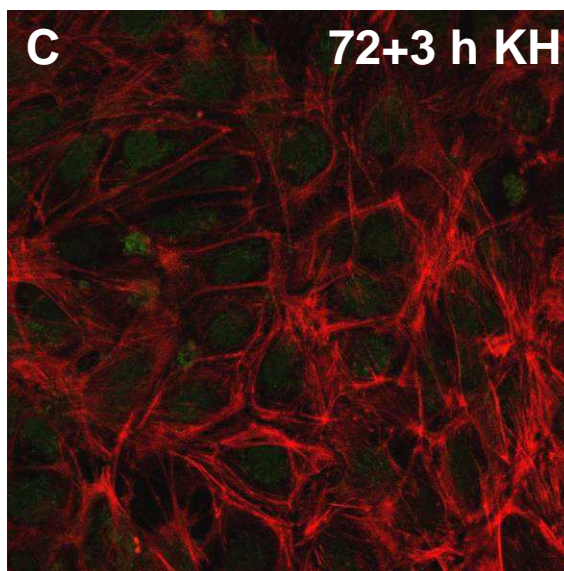
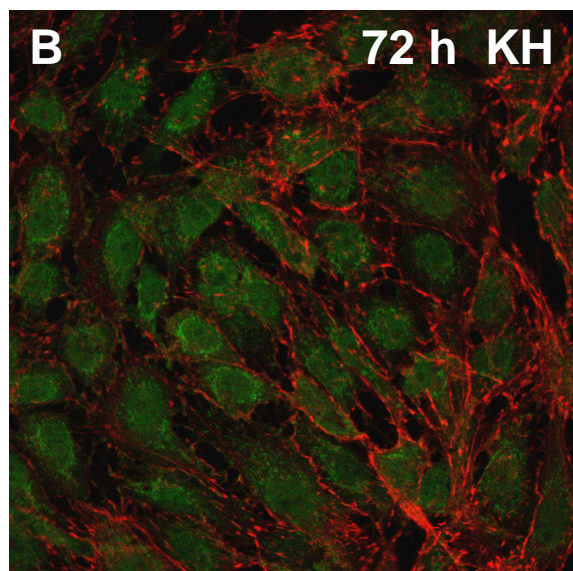






**Abb. 22: Chloridabhängigkeit der kälte-induzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in KH-Puffer (B) bzw. KH-Lactobionat-Puffer (D) mit 1 mM Desferal kaltinkubiert und anschließend für 3 Stunden in M199-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt (C, E). Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNase I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



### **3.3.5. Permeabilitätsmessungen an endothelialen Monolayern**

Zur besseren Quantifizierung der morphologisch sichtbaren Permeabilitätserhöhung der endothelialen Monolayer in der Kälte wurde die Durchlässigkeit der auf einer porösen Membran kultivierten Zellen für FITC-markiertes Dextran, einem Standardassay für die Bestimmung der Schrankenfunktion (17), gemessen.

Bei 37°C konnte nach 15 min über eine zellfreie Membran ein kompletter Konzentrationsausgleich zwischen den beiden Kompartimenten gemessen werden. War die Membran hingegen mit einem kompletten endothelialen Monolayer bewachsen, konnte innerhalb dieser Zeit nur weniger als 5 % FITC-Dextran diese Barriere passieren.

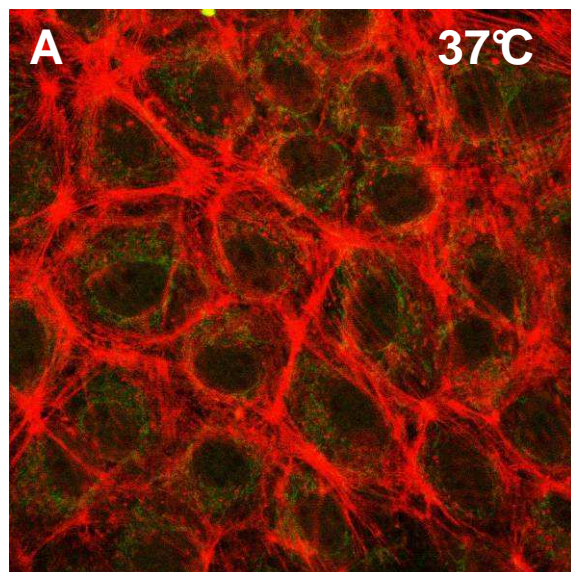
Nach einer 72-stündigen Kaltinkubation (4°C) von Schweineaortenendothelzellen in KH + Desferal (1 mM) konnte in den nachfolgenden Messungen nicht der erwartete Fluoreszenzanstieg im unteren Kompartiment beobachtet werden. Kontrollen zeigten jedoch, dass auch unter zellfreien Bedingungen (= „maximale Permeabilität des Monolayers“) bei unterschiedlichen Porengröße (1-8 µm) bei 4°C kein Fluoreszenzanstieg in den unten liegenden Wells gemessen werden konnte. Diese Methode ist also (wahrscheinlich aufgrund einer gesteigerten Adhäsion von FITC-Dextran an der porösen Membran der Inserts in der Kälte) für das Modell der Kaltinkubation nicht geeignet.

### **3.3.6. Untersuchungen zum Einfluss bekannter Mechanismen einer endothelialen Permeabilitätserhöhung auf den kälteinduzierten Aktinabbau**

Als ein Grund der endothelialen Dysfunktion wurde ein Energiemangel beschrieben (77). Die Zugabe von 10 mM Glukose zu den glykolytisch hoch aktiven Endothelzellen konnte jedoch weder die Lückenbildung im endothelialen Monolayer noch den Abbau des Aktin-Cytoskeletts während der Kaltinkubation verhindern (Abb. 23).

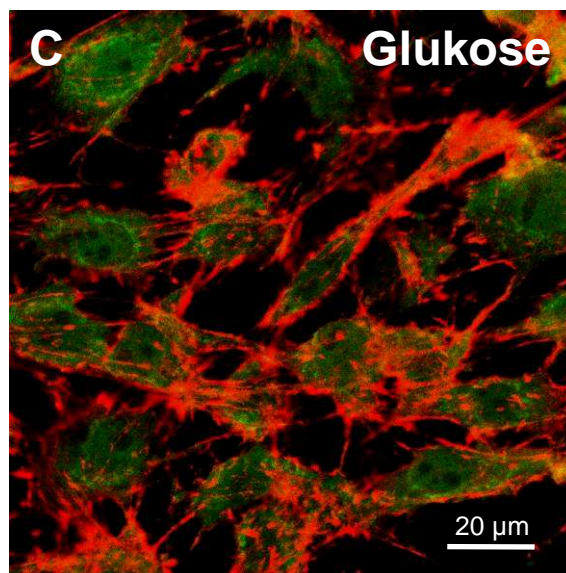
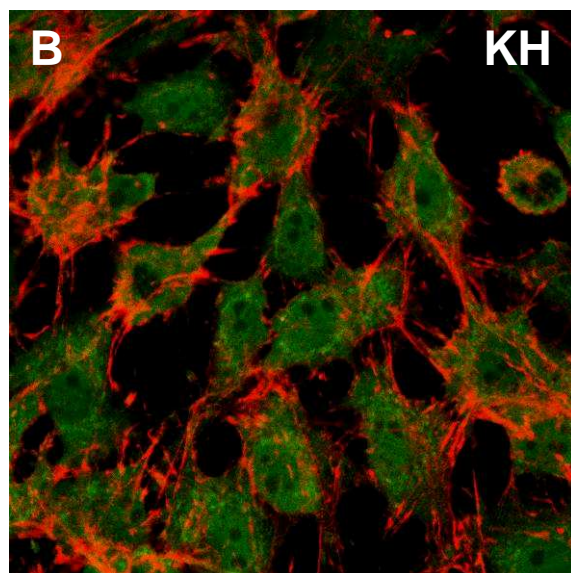
Um die Mechanismen des (in Abb. 17-22 dargestellten) kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Schrankenfunktion und der Aktin-Desintegration aufzuklären, wurden zunächst die in der Literatur bei anderen Schädigungsmechanismen, wie zum Beispiel entzündlichen Prozessen, postulierten Signalwege geprüft (zu den Angriffspunkten der Inhibitoren siehe auch Abb. 50).





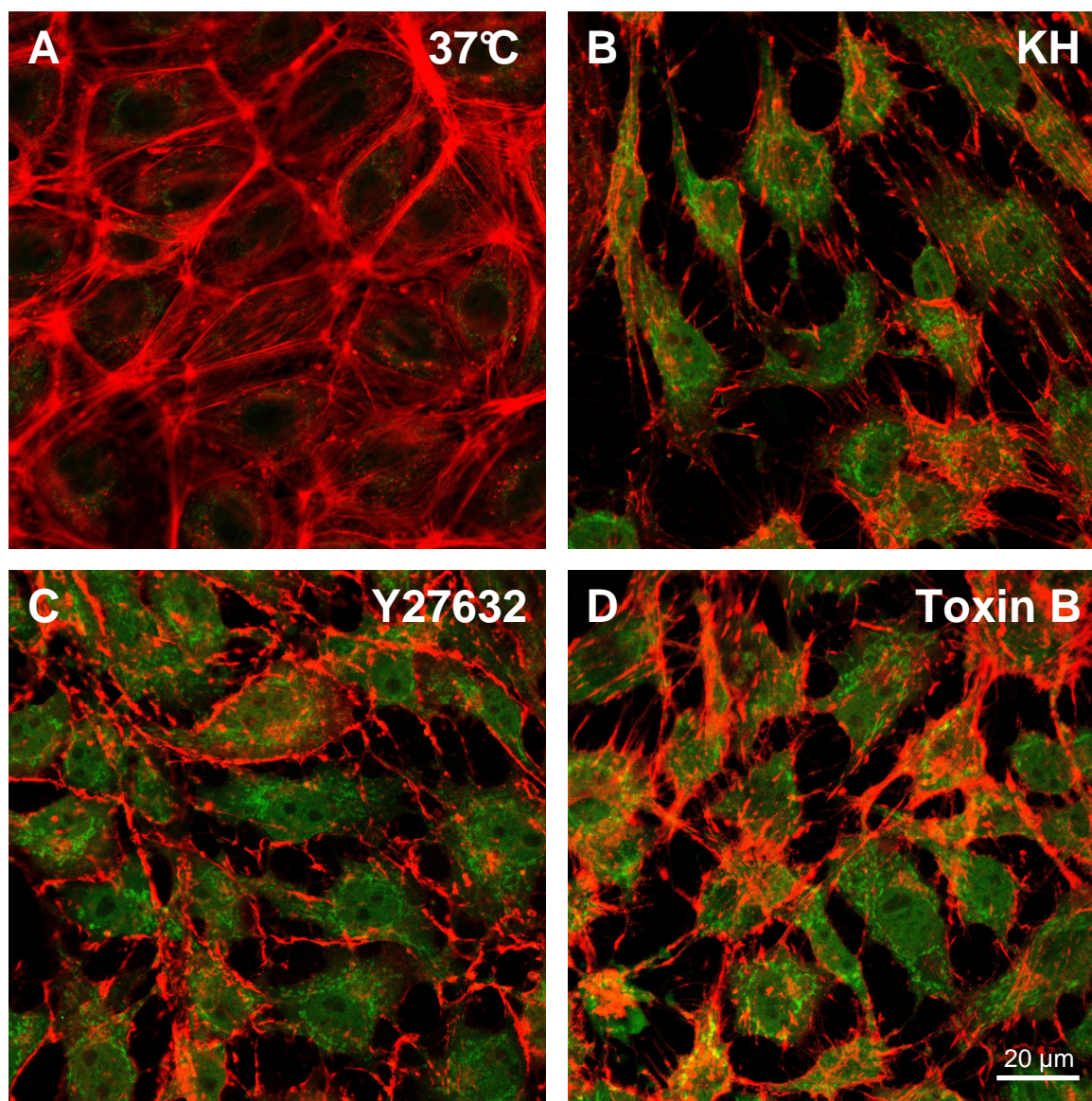
**Abb. 23: Fehlender Einfluss von Glukose auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytosketts von Schweineaorten-endothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde 10 mM Glukose zugesetzt (C). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



In verschiedenen anderen Modellen des Verlustes der endothelialen Schrankenfunktion wird eine Beteiligung des Rho/ROCK Pathways diskutiert (1,10,15,143,156). Aus diesem Grund wurden die Wirkung des Rho-Inhibitors Toxin B (10 ng/mL) und des ROCK-Inhibitors Y27632 (10  $\mu\text{M}$ ) auf die kälteinduzierten Veränderungen getestet. Wie in Abbildung 24 C+D zu sehen ist, waren jedoch beide Substanzen nicht in der Lage die Lückenbildung oder den Aktin-Abbau in der Kälte bedeutsam zu beeinflussen (Abb. 24).





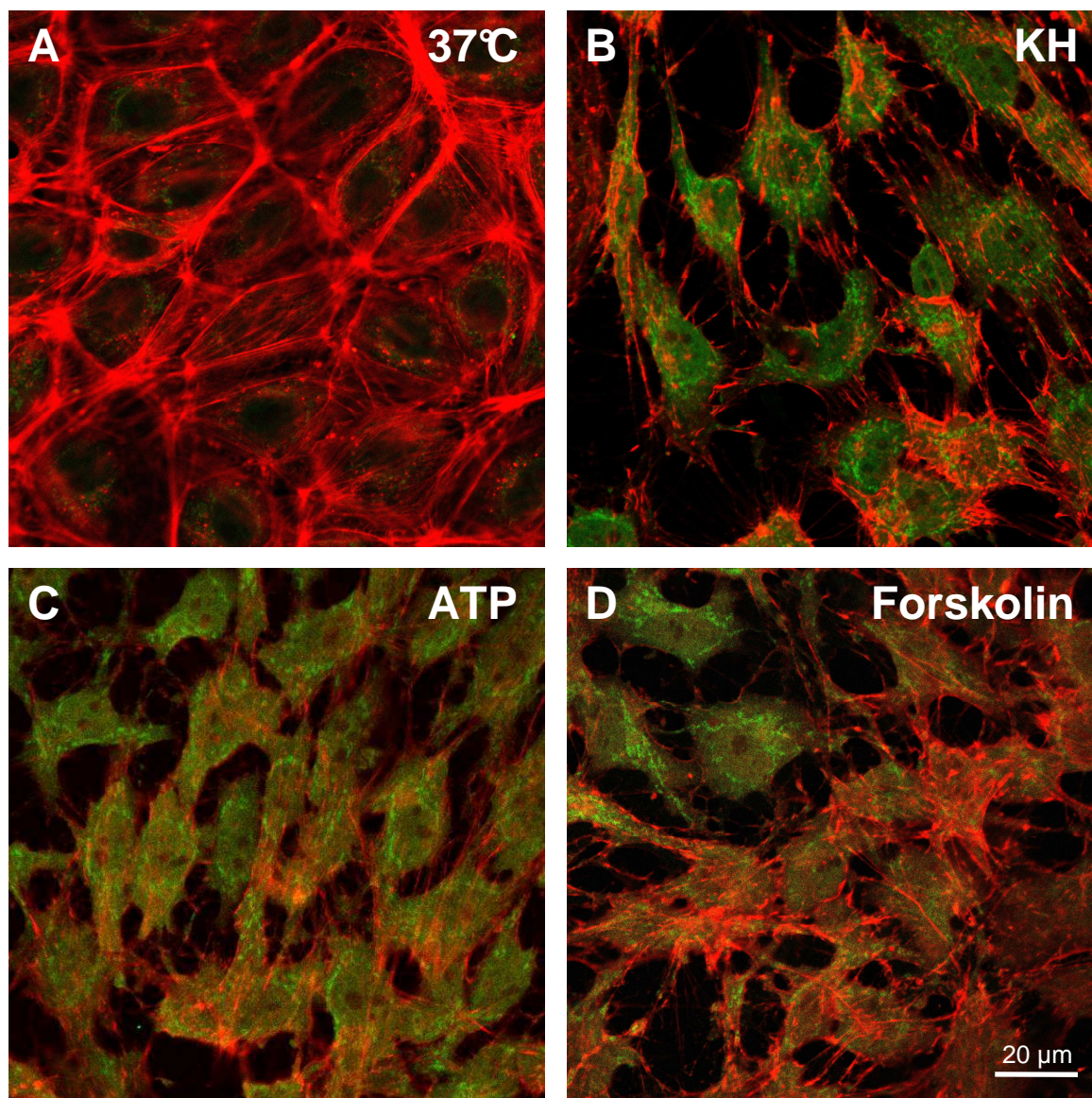
**Abb. 24: Fehlender Einfluss von Rho-/ROCK-Inhibitoren auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde der ROCK-Inhibitor Y27632 (10 µM; C) oder der Rho-Inhibitor Toxin B (10 ng/ml; D) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

Extrazelluläres ATP kann als Signalmolekül zu einer Inaktivierung des kontraktile Apparates der Endothelzellen beitragen (56). Eine Hemmung der Aktin-Desintegration und der Lückenbildung in der Kälte konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 25 C). Das Signalmolekül cAMP wird ebenfalls als ein Stabilisator der endothelialen Schrankenfunktion diskutiert (9,139). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kann durch die



pharmakologische Substanz Forskolin erreicht werden (9). Forskolin ist ein Stimulator der Adenylatcyclase, welche wiederum die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. Allerdings bot auch Forskolin (10  $\mu$ M) keinen Schutz vor der kälteinduzierten Lückenbildung oder der kälteinduzierten Cytoskelett-Veränderungen (Abb. 25 D).

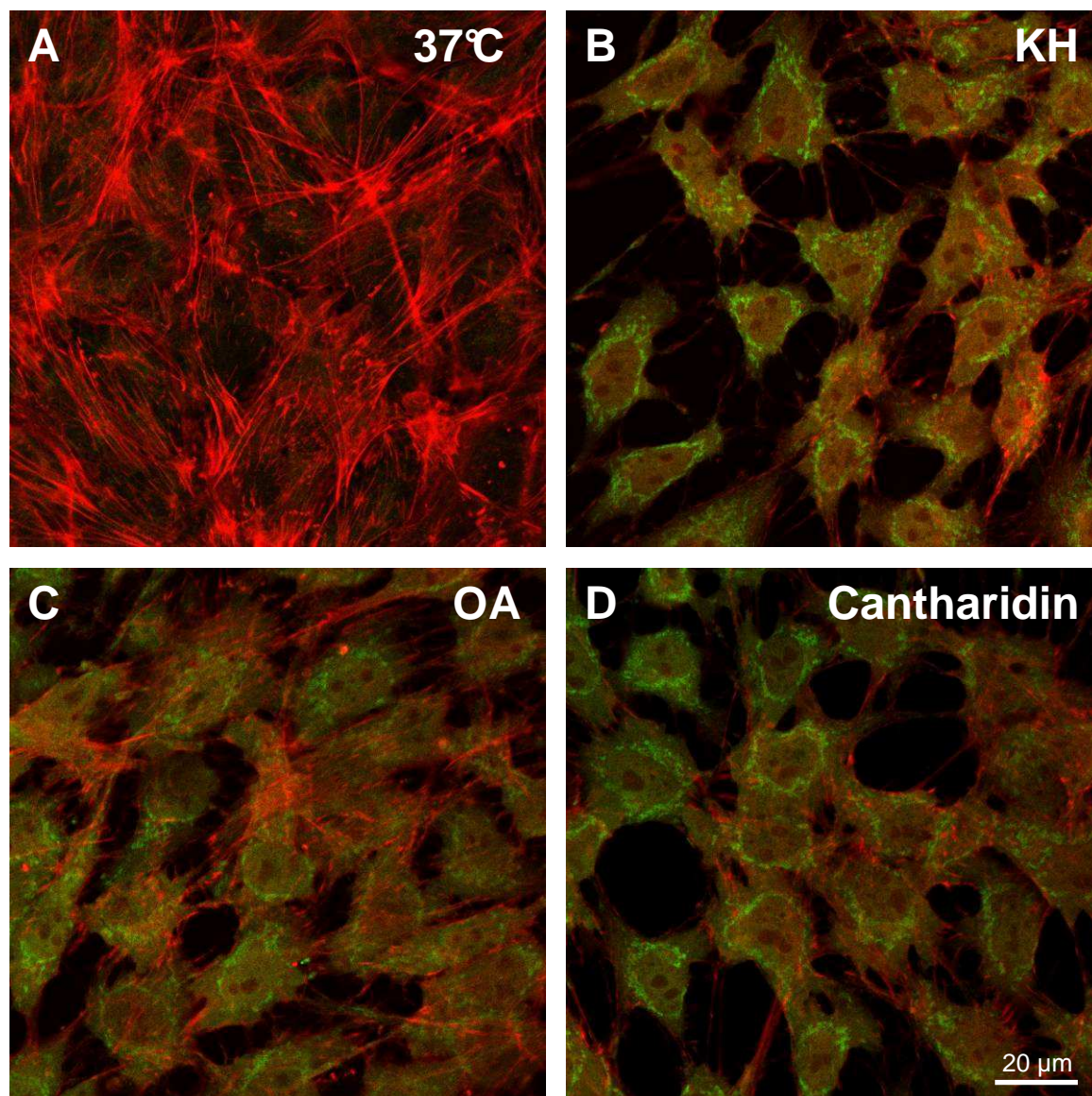


**Abb. 25: Fehlender Einfluss von extrazellulärem ATP und Forskolin auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde ATP (10  $\mu$ M; C) oder Forskolin (10  $\mu$ M; D) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543$  nm,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585$  nm) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNase I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 505$ -530 nm) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



Weiterhin gibt es Hinweise, dass der Phosphorylierungsstatus einiger Proteine wie LIM-Kinase oder Cofilin eine entscheidende Rolle beim Umbau des Aktin-Cytoskeletts und damit bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Schrankenfunktion spielt (50,142,146). Hier sind insbesondere die Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A von Bedeutung, da sie eine Dephosphorylierung von Cofilin und damit eine Aktin-Destabilisierung verursachen können.

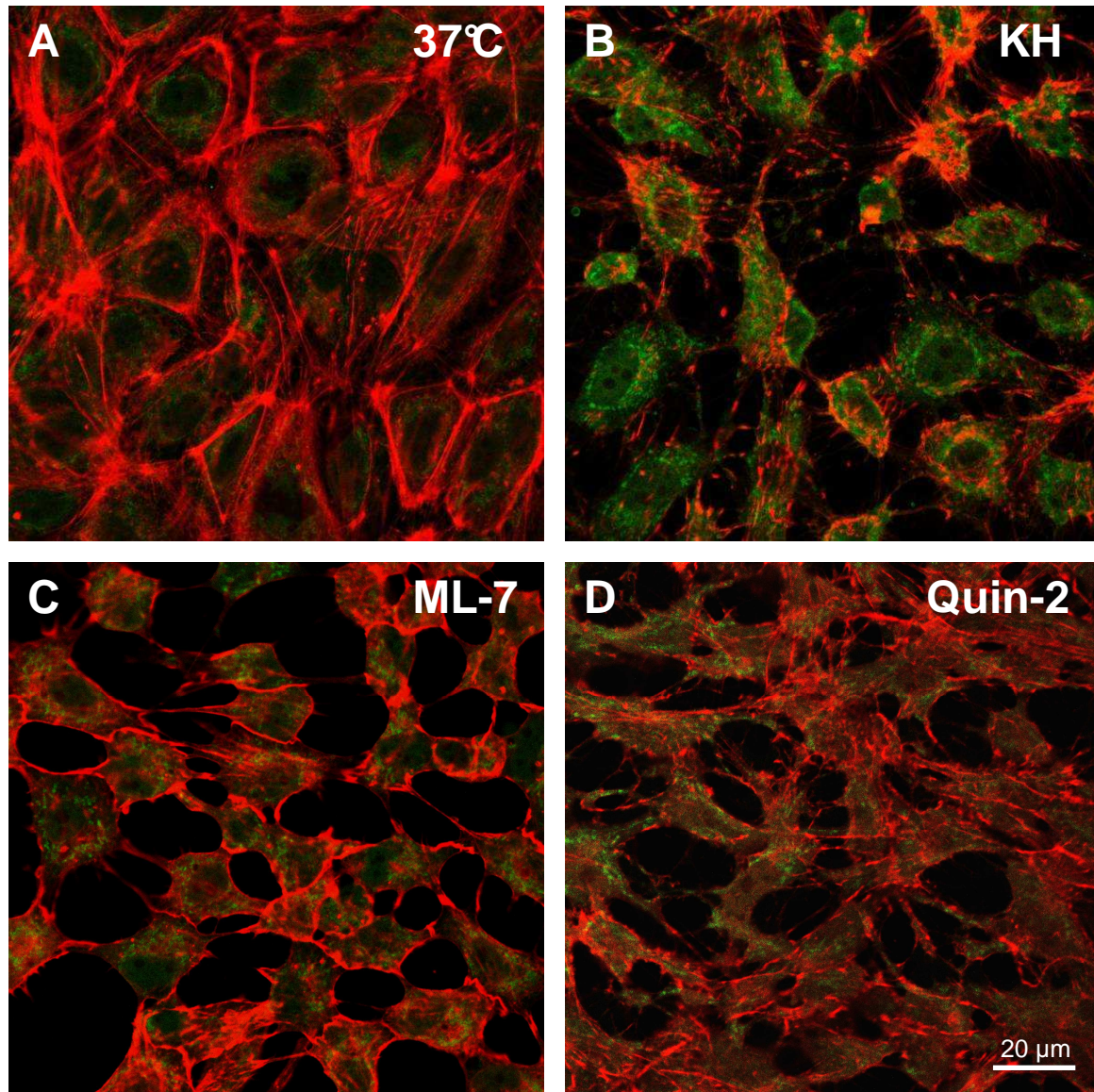


**Abb. 26: Fehlender Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde Okadasäure (OA, 5 nM; C) oder Cantharidin (10 nM; D) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNase I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



Daher wurde die Wirkung der Phosphatase-Inhibitoren Okadasäure (Abb. 26 C), Cantharidin (Abb. 26 D) und Natriumorthovanadat (nicht gezeigt) auf die kälteinduzierten Veränderungen getestet – ohne positives Ergebnis. Die calciumabhängige MLCK ist ein zentraler Regulator des kontraktiles Apparates der Endothelzellen, aber weder der MLCK-Inhibitor ML-7 (Abb. 27 C) noch der Calciumchelator Quin-2 (Abb. 27 D) waren in der Lage, die Zell-Retraktion, die Lückenbildung oder die Cytoskelett-Veränderungen in der Kälte zu verhindern.

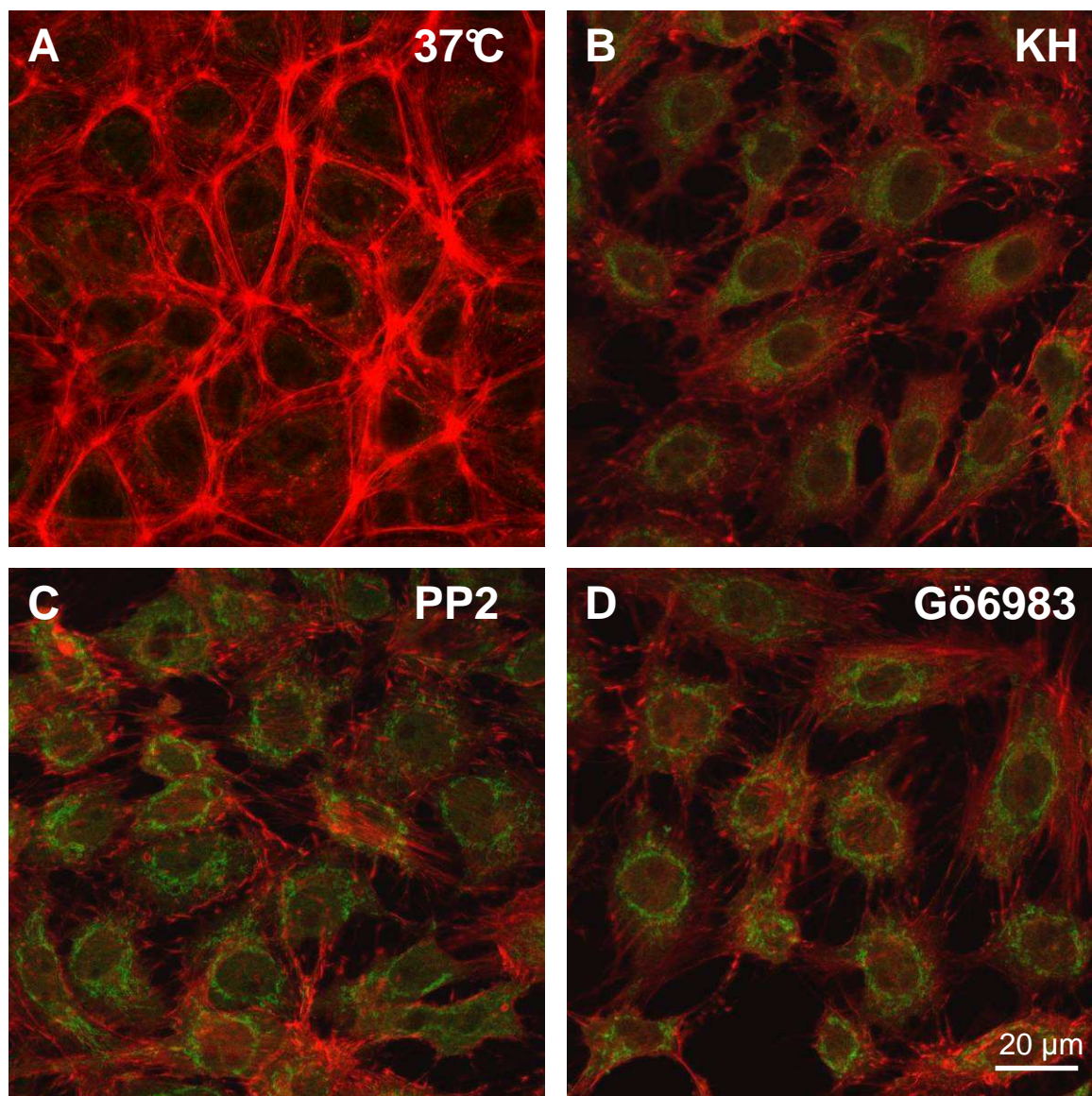


**Abb. 27: Fehlender Einfluss von ML-7 und Quin-2 auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde der MLCK-Inhibitor ML-7 (1 µM; C) oder der Calciumchelator Quin-2 (10 µM; D) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



In der Literatur wird weiterhin eine Beteiligung von Proteinkinasen an der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion diskutiert (2,61,170). Aber auch die Src-Kinase-Inhibitoren PP2 (Abb. 28 C) und SU6656 (nicht gezeigt), sowie die Proteinkinase C-Inhibitoren Gö6983 (Abb. 28 D) und GF109203x (nicht gezeigt) hatten keinen Einfluss auf den kälteinduzierten Aktinabbau.



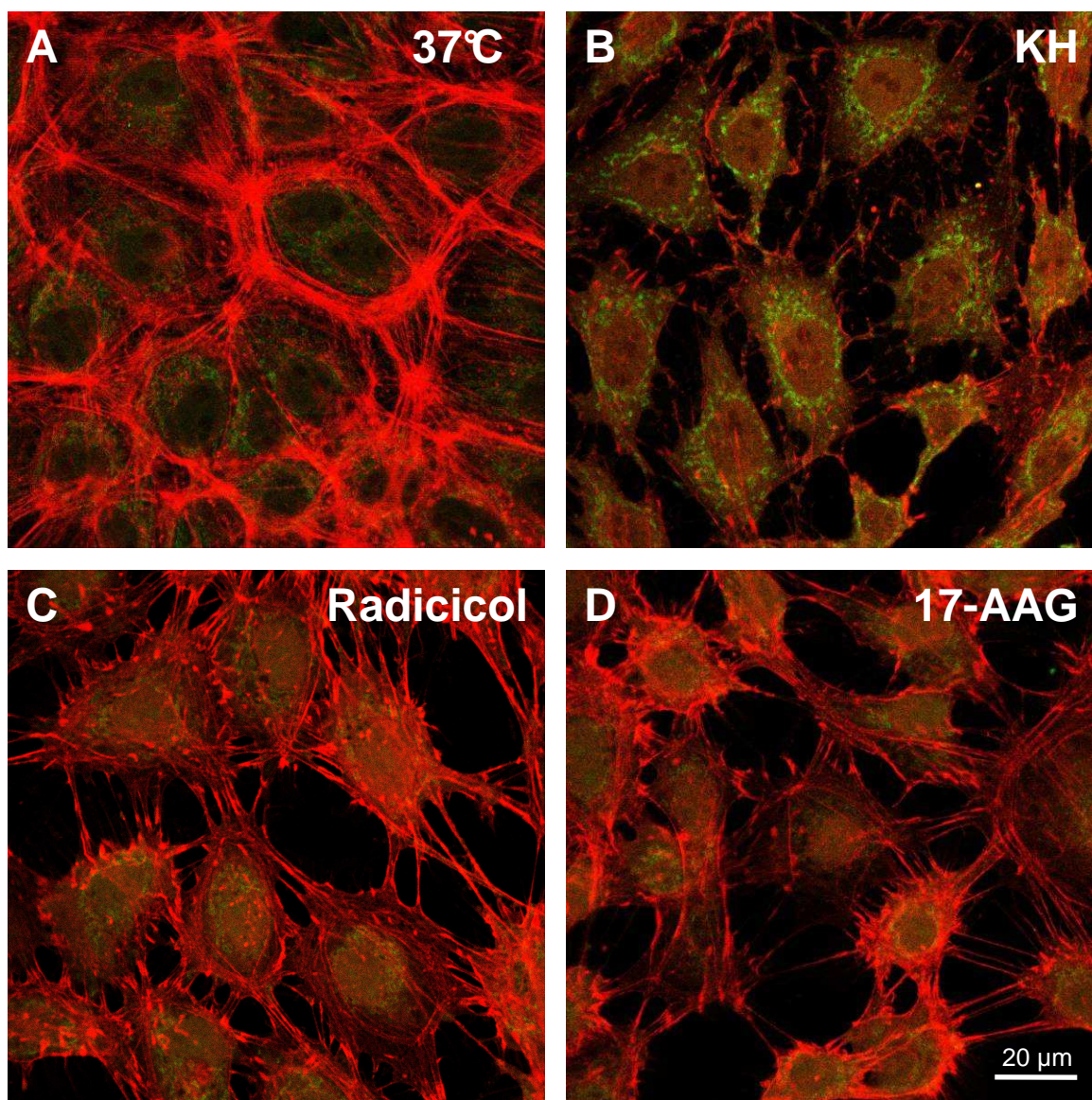
**Abb. 28: Fehlender Einfluss verschiedener Proteinkinase-Inhibitoren auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde der Src-Kinase-Inhibitor PP2 (10 µM; C) oder der Proteinkinase C-Inhibitor Gö6983 (1 µM; D) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



### 3.3.7. Einfluss von Heat Shock Protein 90-Inhibitoren auf die Aktinfaserstruktur und die endotheliale Schrankenfunktion in der Kälte

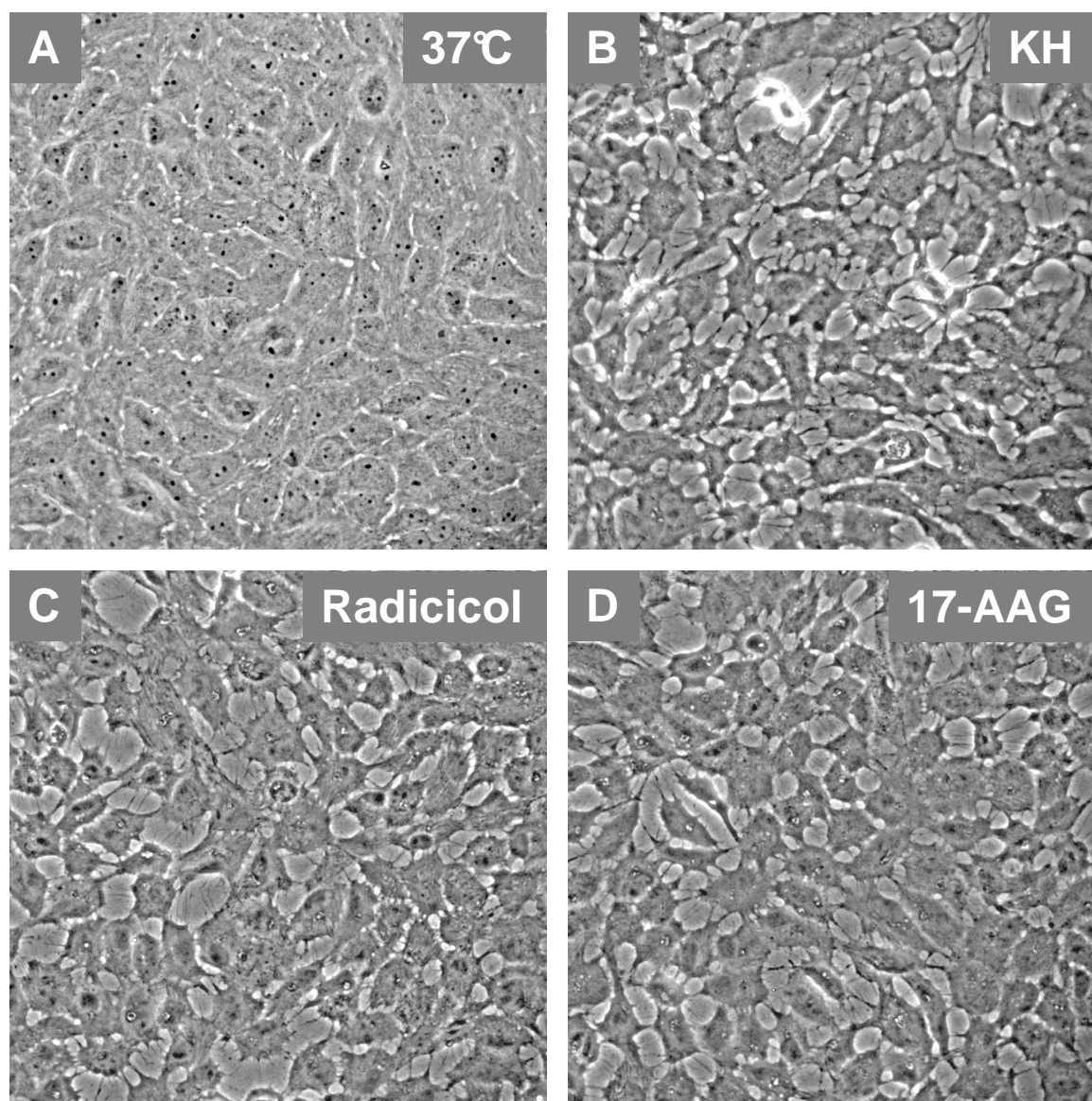
In einem Modell des TGF- $\beta$ -induzierten Verlustes der endothelialen Barrierefunktion wurde kürzlich gezeigt, dass HSP90-Inhibitoren einen Effekt auf die Struktur des Aktin-Cytoskeletts haben und die endotheliale Schrankenfunktion stärken können (3).



**Abb. 29: Einfluss der HSP90-Inhibitoren Radicicol und 17-AAG auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurden die HSP90-Inhibitoren Radicicol (4 µg/ml; C) oder 17-AAG (4 µg/ml; D) zugesetzt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNase I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

Wurde der HSP90-Inhibitor Radicicol (4  $\mu\text{g/mL}$ ) während der Kaltinkubation hinzugegeben, konnte zwar nicht die Zerstörung des peripheren Aktinbandes verhindert werden, jedoch wurden im Gegensatz zur Inkubation in KH-Puffer mit Desferal (Abb. 29 B) etliche der Aktin-Fasern erhalten (Abb. 29 C). Dieser Effekt konnte mit einem zweiten HSP90-Inhibitor (17-AAG) nochmals bestätigt werden (Abb. 29 D). Auf die im Phasenkontrast zu beobachtenden kälteinduzierten Veränderungen (Abb. 30 B) hatten die HSP90-Inhibitoren keinen Einfluss. Sie konnten die kälteinduzierte Retraktion und die Lückenbildung in der Kälte nicht verhindern (Abb. 30 C, D).



**Abb. 30: Fehlender Einfluss von Radicicol und 17-AAG auf die Morphologie von Schweineaortenendothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurden die HSP90-Inhibitoren Radicicol (4  $\mu\text{g/mL}$ ; C) oder 17-AAG (4  $\mu\text{g/mL}$ ; D) zugesetzt. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie nach der Kaltinkubation untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

### 3.3.8. Beteiligung der Mikrotubuli an den kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts und der endothelialen Schrankenfunktion

Ein weiterer Bestandteil des Cytoskeletts sind die Mikrotubuli. Sie können über eine Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\alpha$ -Tubulin dargestellt werden.

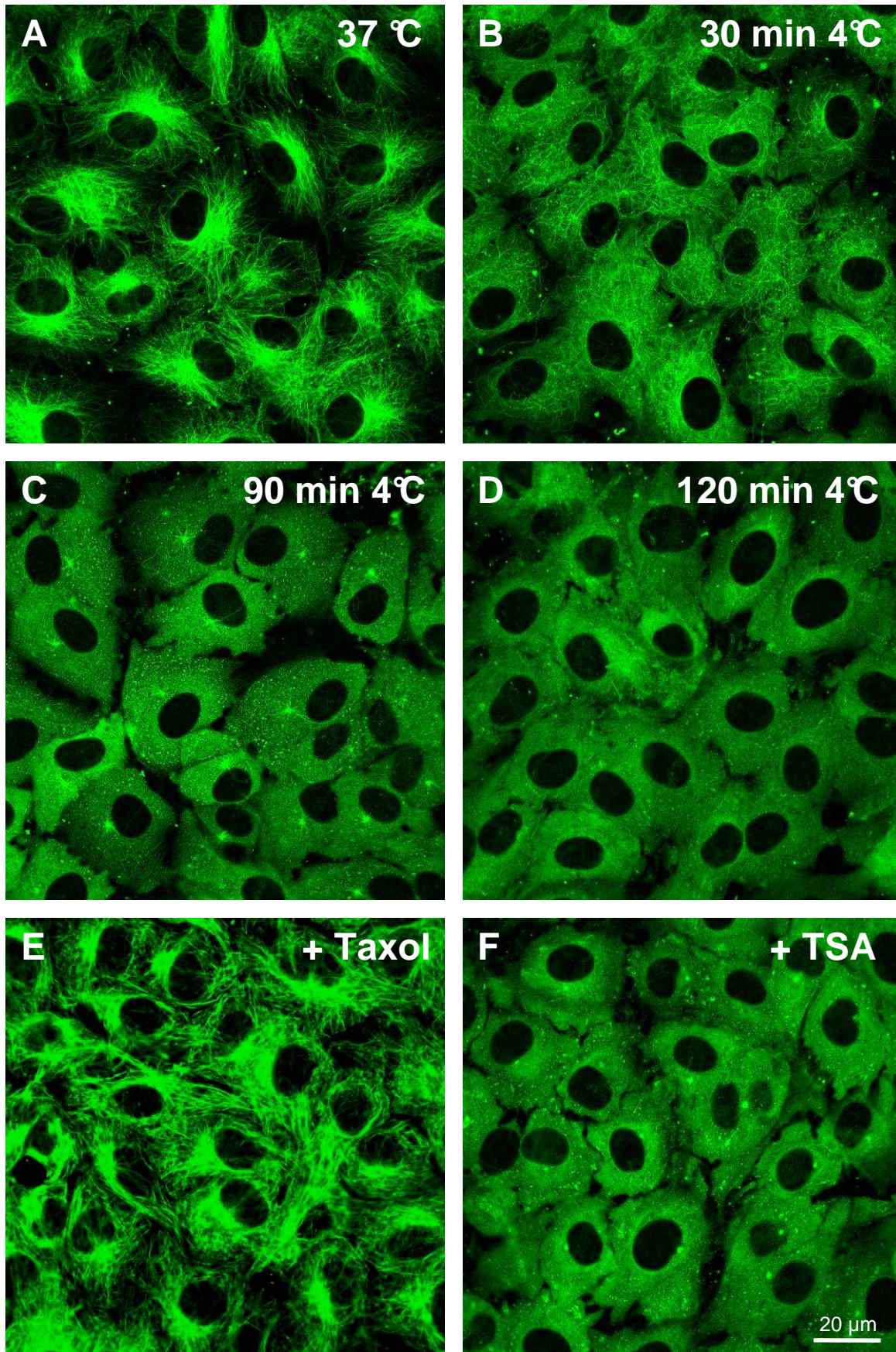
Kontrollzellen bei 37°C zeigten ein feines, die ganze Zelle durchspannendes Mikrotubuli-Netzwerk (Abb. 31 A). Eine Inkubation bei 4°C führte zu einem sehr schnellen Abbau der Mikrotubuli. Schon nach 30 min bei 4°C in KH-Puffer + Desferal war ein großer Teil der Mikrotubuli verschwunden (Abb. 31 B). Nach 90 min Kaltinkubation war nur noch eine leichte Färbung in der Nähe des Zentrosoms zu erkennen (Abb. 31 C) und nach zweistündiger Kaltinkubation waren die Mikrotubuli vollständig verschwunden (Abb. 31 D). Wie zu erwarten war, konnte die Mikrotubuli-Struktur durch die Zugabe des Mikrotubuli-Stabilisators Taxol (50  $\mu$ M) während der Kaltinkubation erhalten bzw. noch verstärkt werden (Abb. 31 E). Histondeacetylase-Inhibitoren wird ebenfalls ein Mikrotubuli-stabilisierender Effekt zugeschrieben (37,136), doch die Zugabe von Trichostatin A (TSA) während der Kaltinkubation hatte keinen Effekt auf den kälteinduzierten Abbau der Mikrotubuli (Abb. 31 F).

Überraschenderweise hatte Taxol jedoch nicht nur einen stabilisierenden Effekt auf die Mikrotubuli, sondern verhinderte bei Zugabe vor der Kaltinkubation auch nach 72 h Inkubation in KH-Puffer + Desferal bei 4°C komplett eine Lückenbildung im endothelialen Monolayer (Abb. 32 E). Zusätzlich wurde auch die Struktur des Aktin-Cytoskeletts während der Kaltinkubation durch die Zugabe von Taxol bewahrt (Abb. 32 F). Sowohl die Aktinfasern als auch der periphere Aktinring waren erhalten und die Färbung von G-Aktin war vergleichbar mit (Wärme-) Kontrollzellen. Lösungsmittelkontrollen konnten einen Einfluss von DMSO auf die kälteinduzierten Veränderungen ausschließen (nicht gezeigt, Bild entspricht der KH-Kontrolle).

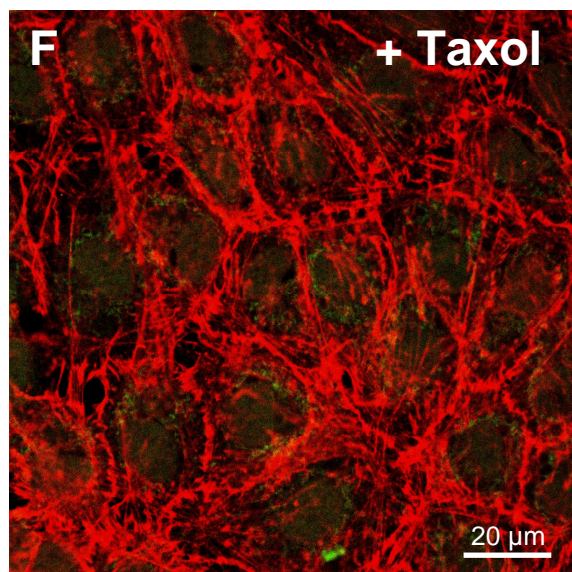
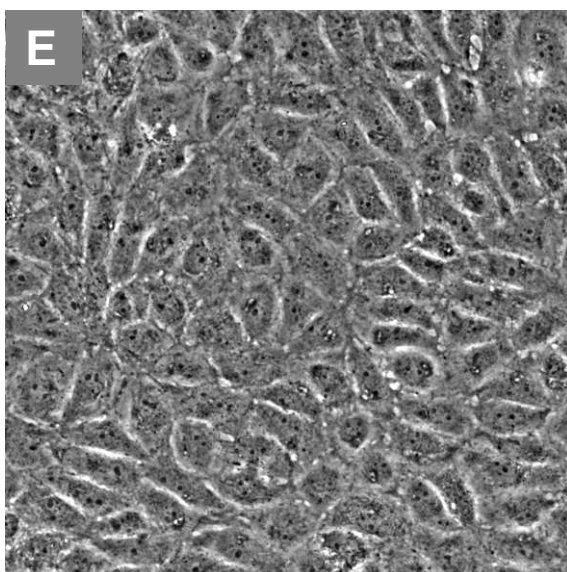
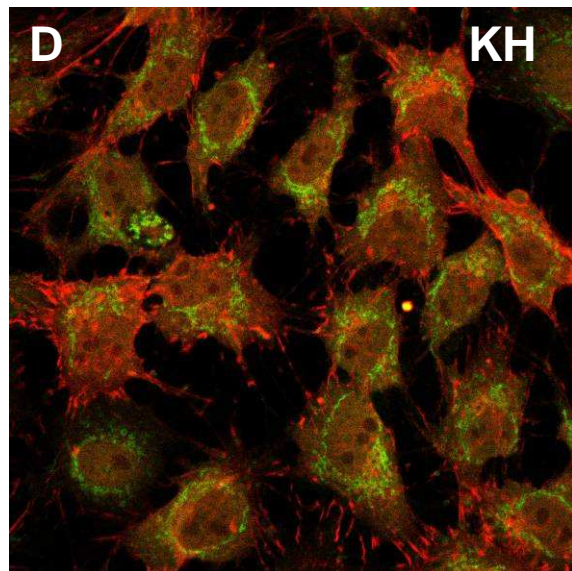
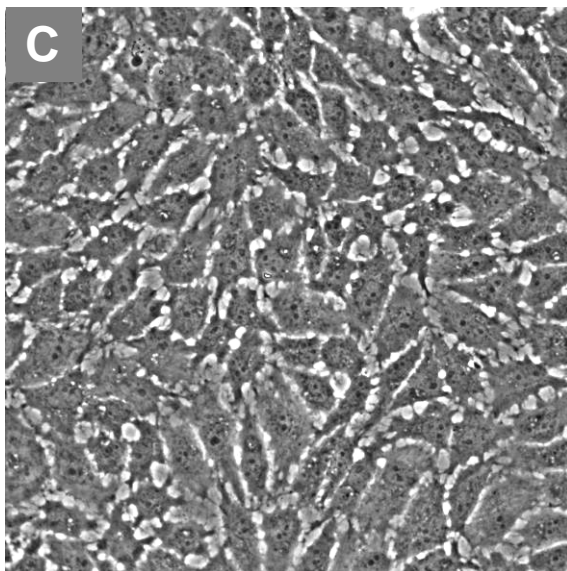
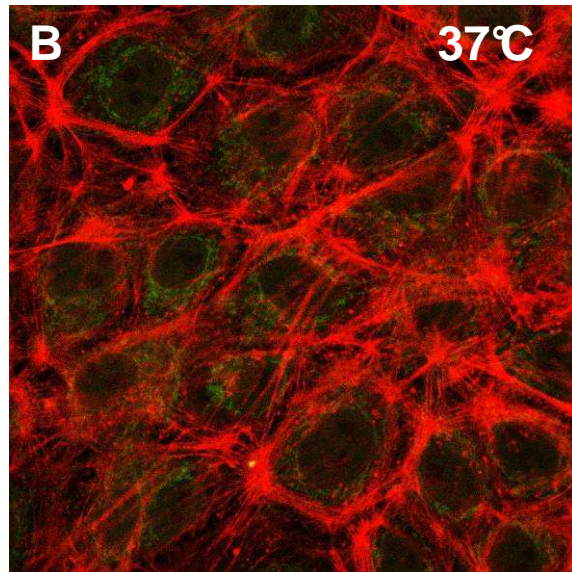
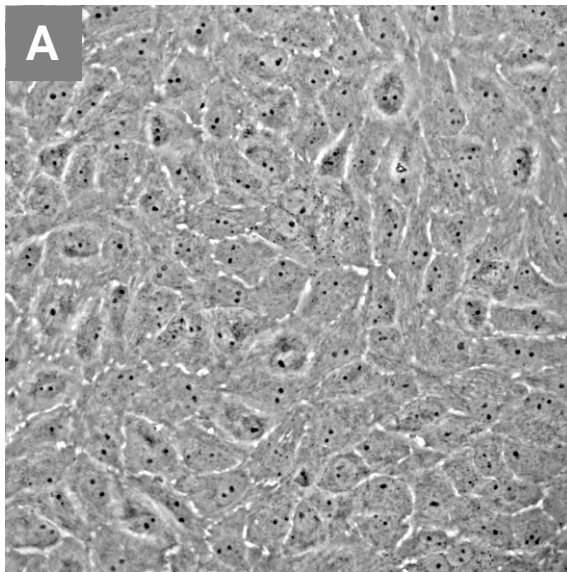
**Abb. 31: Kälteinduzierte Desintegration der Mikrotubuli von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 30 min (B), 90 min (C) und 120 min (D) in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde der Mikrotubuli-Stabilisator Taxol (50  $\mu$ M; E) oder der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA, 500 nM; F) zugesetzt und dann für 120 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton lysiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli immunhistochemisch mit einem monoclonalen Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 505-530 nm, Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.









**Abb. 32: Einfluss von Taxol auf die Morphologie und das Aktin-Cytoskelett von Schweineaorten-endothelzellen nach Kaltinkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal (C, D) und/oder dem Mikrotubuli-Stabilisator Taxol (50  $\mu$ M, E, F) bei 4°C inkubiert. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie nach der Kaltinkubation untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Ein Teil der Ansätze wurde mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543$  nm,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585$  nm) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530$  nm) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

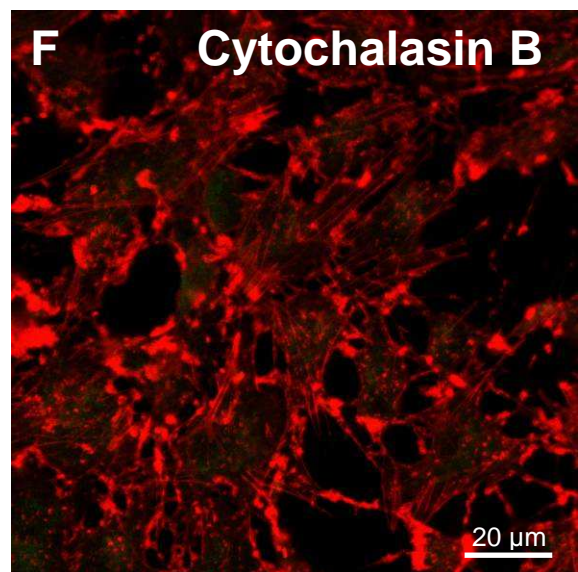
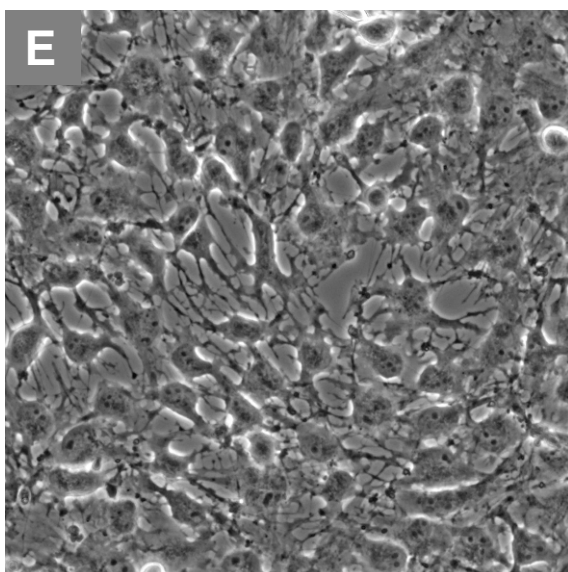
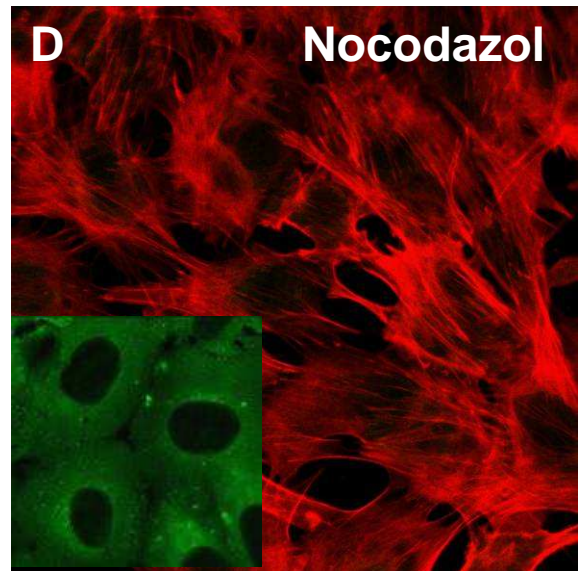
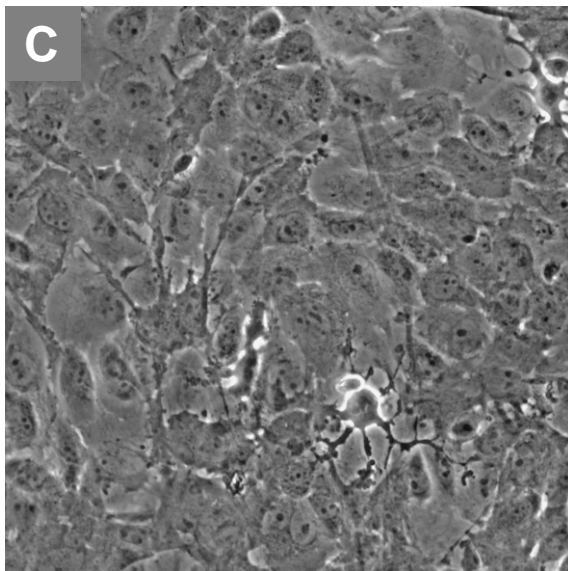
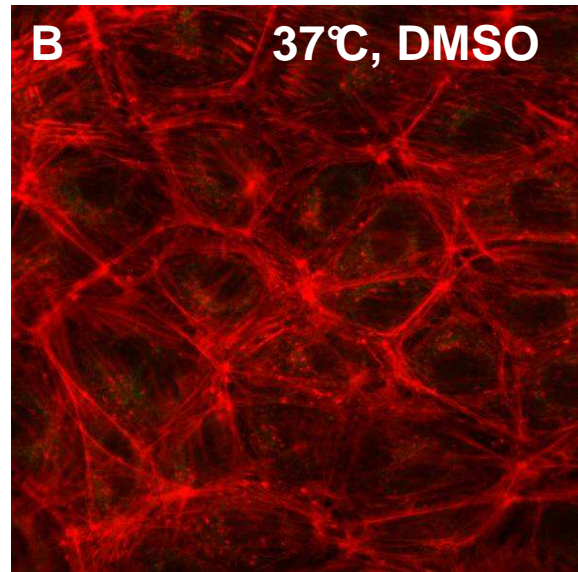
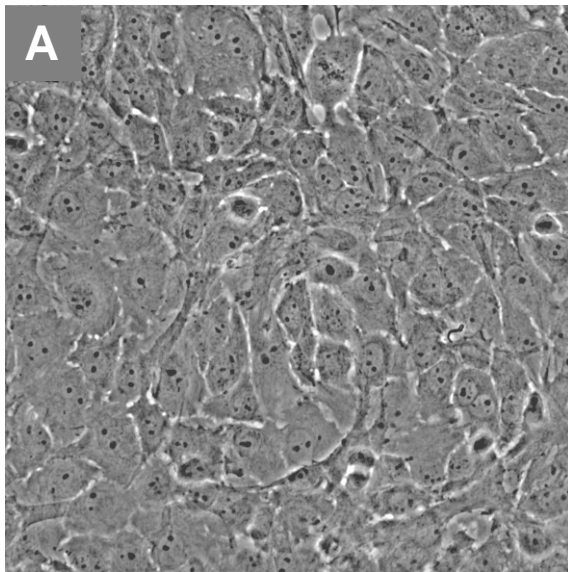
Die bis hierhin erzielten Ergebnisse lassen eine während der Kaltinkubation erfolgende Sequenz von Mikrotubuli-Desintegration  $\rightarrow$  Aktin-Desintegration  $\rightarrow$  Lückenbildung vermuten. Um zusätzliche Belege für diese Sequenz zu erhalten, wurden die Substanzen Nocodazol und Cytochalasin B eingesetzt. Nocodazol löst eine Depolymerisierung der Mikrotubuli aus und Cytochalasin B verursacht eine Verkürzung der Aktinfilamente, indem es die Addition von Aktin-Monomeren am schnell wachsenden Ende der Polymere hemmt. Wie die Immunfluoreszenzaufnahme zeigt, führte eine einstündige Inkubation mit Nocodazol bei 37°C zu einer vollständigen Desintegration der Mikrotubuli (Abb. 33 D Inset). Gleichzeitig verursachte Nocodazol eine Bildung von Aktin-Stressfasern und eine Lückenbildung zwischen benachbarten Endothelzellen (Abb. 33 C, D), d.h. Nocodazol verursachte zumindest zum Teil die gleichen Veränderungen wie eine Kaltinkubation. Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen Einfluss auf die Zellen (Abb. 33 A, B).

Eine Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B (60 min, 37°C) resultierte in einem ähnlichen Erscheinungsbild in der Phasenkontrast-Mikroskopie wie eine längere Kaltinkubation (Abb. 33 E). Die Zellen zeigten eine deutliche Retraktion und es war eine ausgeprägte Lückenbildung zu beobachten. Eine Aktin-Färbung mit TRITC-Phalloidin und Alexa Fluor DNAse I machte einen Verlust des peripheren Aktinrings und eines großen Teils der Aktinfasern deutlich (Abb. 33 F). Eine Kondensation der Aktinfasern zu dicken, kurzen Aktinklumpen verhinderte jedoch anscheinend einen Anstieg des G-Aktin-Levels. Zusammengefasst zeigten damit sowohl eine pharmakologische Zerstörung der Mikrotubuli als auch des Aktin-Netzwerkes Veränderungen an Endothelzellen, die zumindest in Teilen den bei Kaltinkubation auftretenden entsprechen.

**Abb. 33: Effekt einer pharmakologischen Mikrotubuli- oder Aktin-Desintegration.**

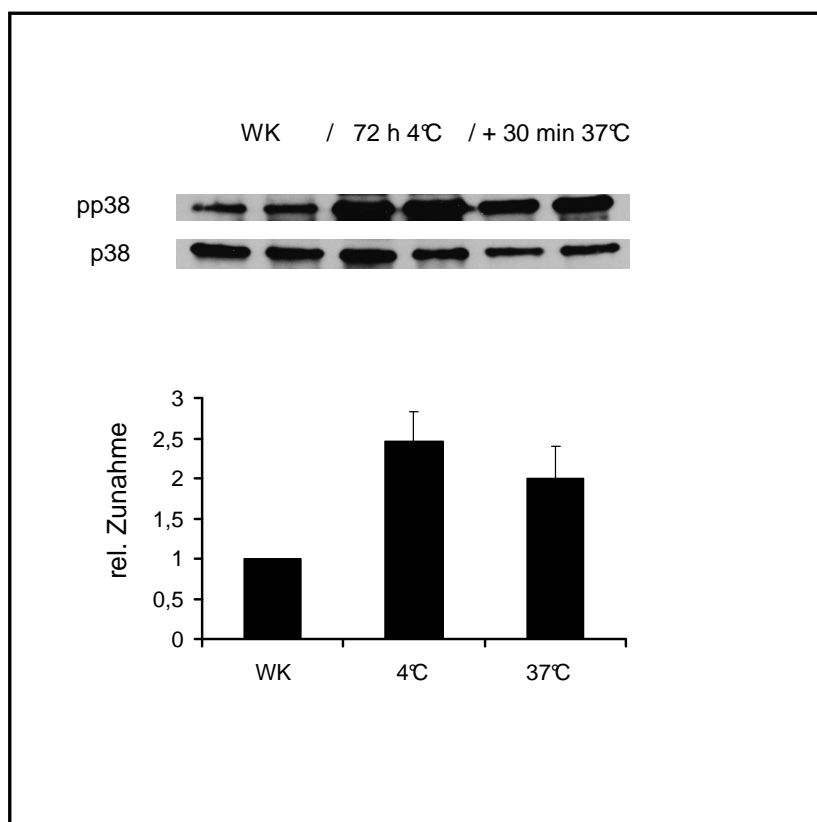
Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (Kontrolle: A, B) wurden für 60 min entweder mit Nocodazol (5  $\mu$ M; C, D) oder Cytochalasin B (10  $\mu$ M; E, F) in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C inkubiert. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Ein Teil der Ansätze wurde mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543$  nm,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585$  nm) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530$  nm) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Die Mikrotubuli (inset F) wurden immunhistochemisch mit einem monoclonalen Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angefärbt ( $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530$  nm). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.





### 3.3.9. Beteiligung von MAP-Kinasen an den kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts und der endothelialen Schrankenfunktion

Es wurde zuvor eine Beteiligung der MAP-Kinase p38 an der Thrombin-vermittelten Erhöhung der endothelialen Permeabilität gezeigt (20). Auch für p44/42 (ERK 1/2) wird eine Beteiligung an der Regulation der endothelialen Schrankenfunktion diskutiert (14). Um eine Beteiligung von MAP-Kinasen am kälteinduzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion zu überprüfen, wurde per Western Blot der Phosphorylierungsstatus von p38 und p44/42 in Zelllysaten von Schweineaortenendothelzellen während der Kaltinkubation und nachfolgender Wiedererwärmung bestimmt. In der Kälte war ein deutlicher Anstieg der p38-Phosphorylierung, d.h. eine p38-Aktivierung zu beobachten (Abb. 34). Nach 72 h Inkubation in KH-Puffer + Desferal bei 4°C war der Phosphorylierungsstatus verglichen mit Kontrollzellen um das ca. 2,5-fache erhöht und reduzierte sich während der Wiedererwärmung wieder leicht.



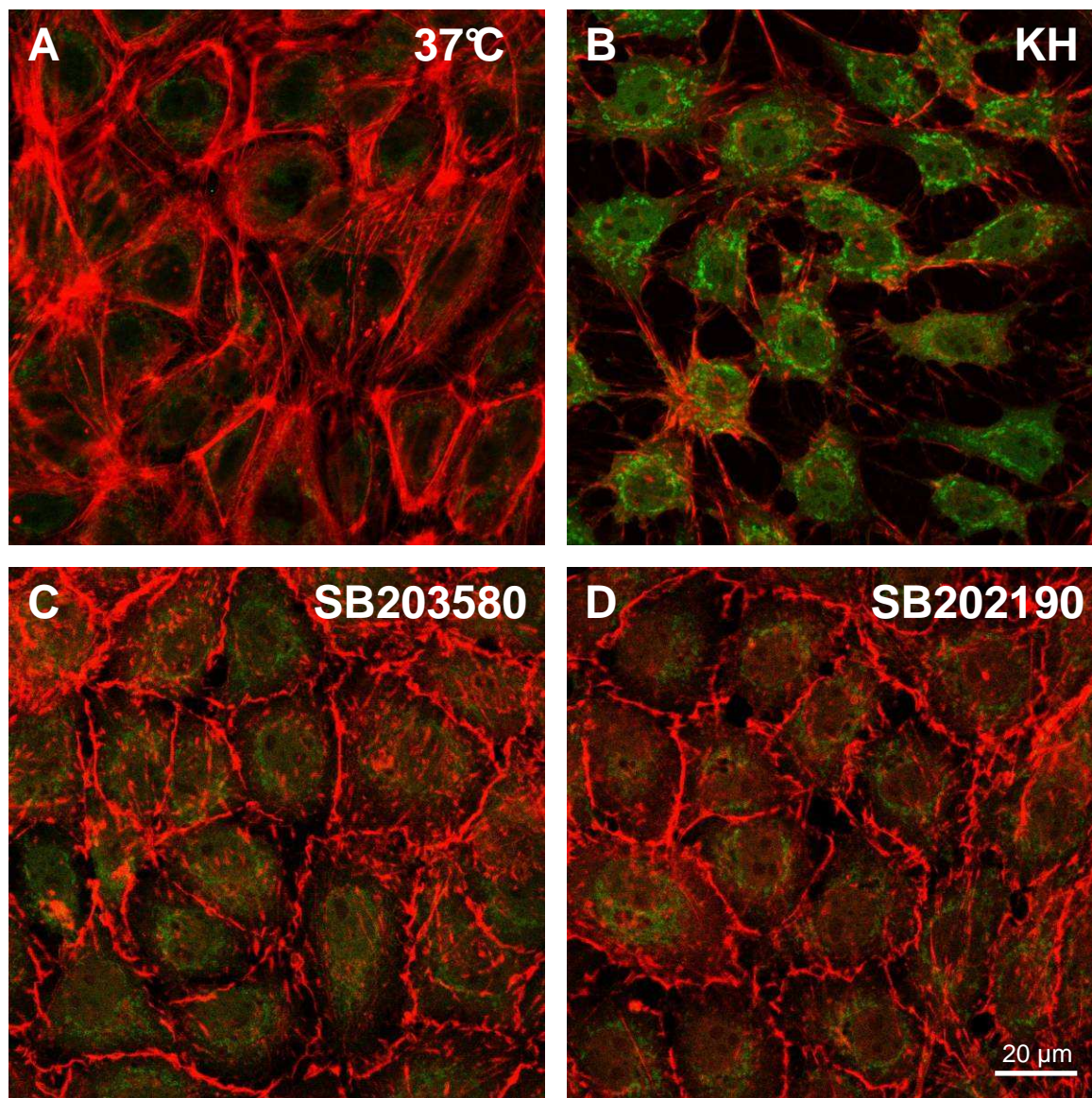
**Abb. 34: p38-MAPK-Phosphorylierung während der Kaltinkubation.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C inkubiert und anschließend teilweise für 30 min auf 37°C wiedererwärmt.

Der Phosphorylierungsstatus von p38 wurde durch Western Blots mit dem korrespondierenden phospho-spezifischen Antikörper festgestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch den Gesamtgehalt von p38 in den Zelllysaten sichergestellt. Abbildung repräsentativ für n=3 Versuche.



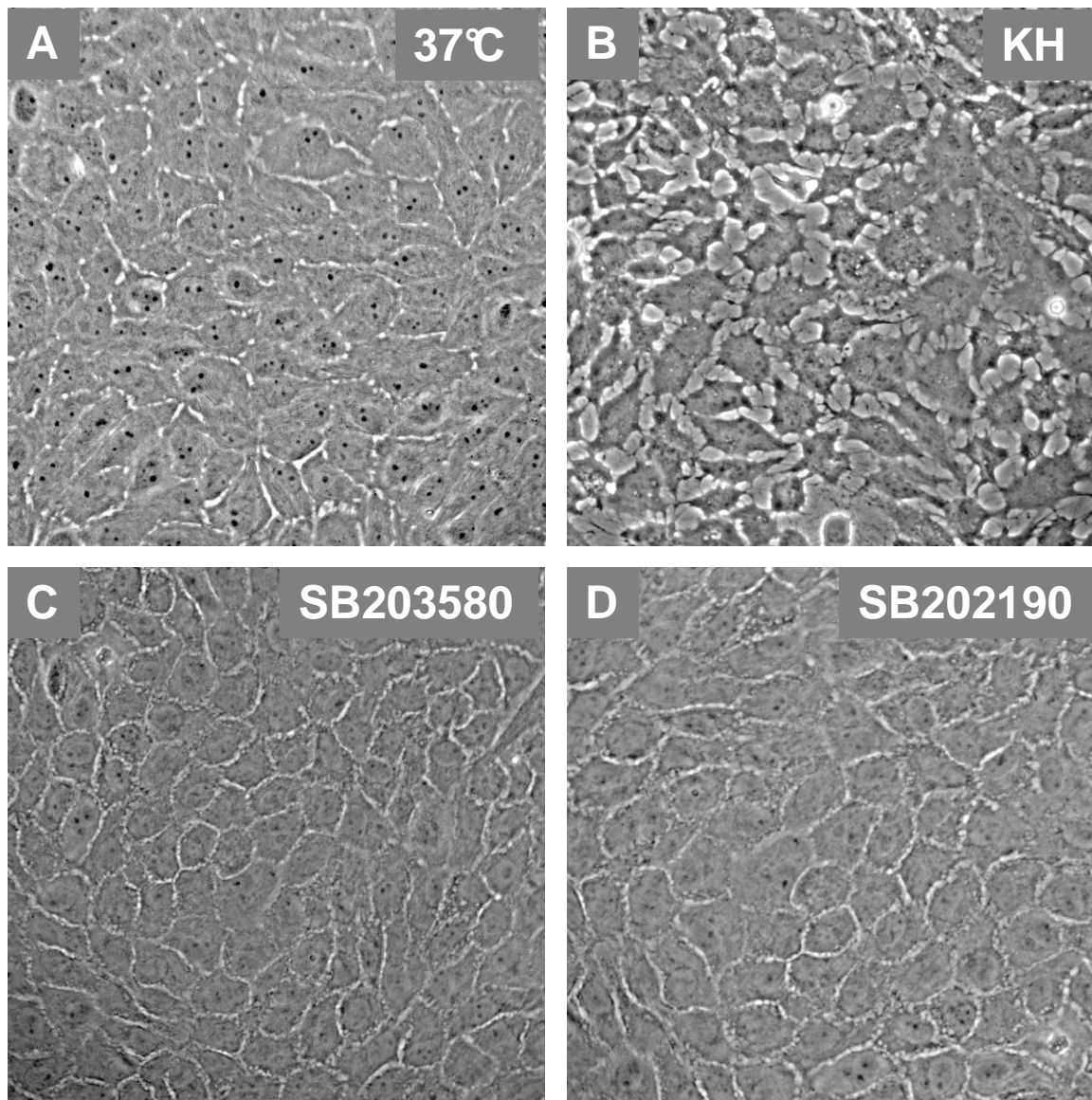
Der Einsatz des p38-Inhibitors SB202190 (10  $\mu$ M) während der Kaltinkubation zeigte einen ausgeprägten Effekt. Bei 72-stündiger Kaltinkubation in KH-Puffer mit Desferal konnte durch den Zusatz von SB202190 das periphere Aktinband erhalten werden (Abb. 35 C). Dieser Befund konnte mit einem zweiten p38-Inhibitor (SB203580) bestätigt werden (Abb. 35 D).



**Abb. 35: Effekt von p38-Inhibitoren auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal (B) bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurden die p38-Inhibitoren SB203580 (10  $\mu$ M, C) oder SB202190 (10  $\mu$ M, D) zugesetzt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

Die Phasenkontrastmikroskopie machte deutlich, dass die p38-Inhibitoren zusätzlich dazu in der Lage waren, das Zusammenziehen der Zellen und die Lückenbildung komplett zu verhindern (Abb. 36 C, D).



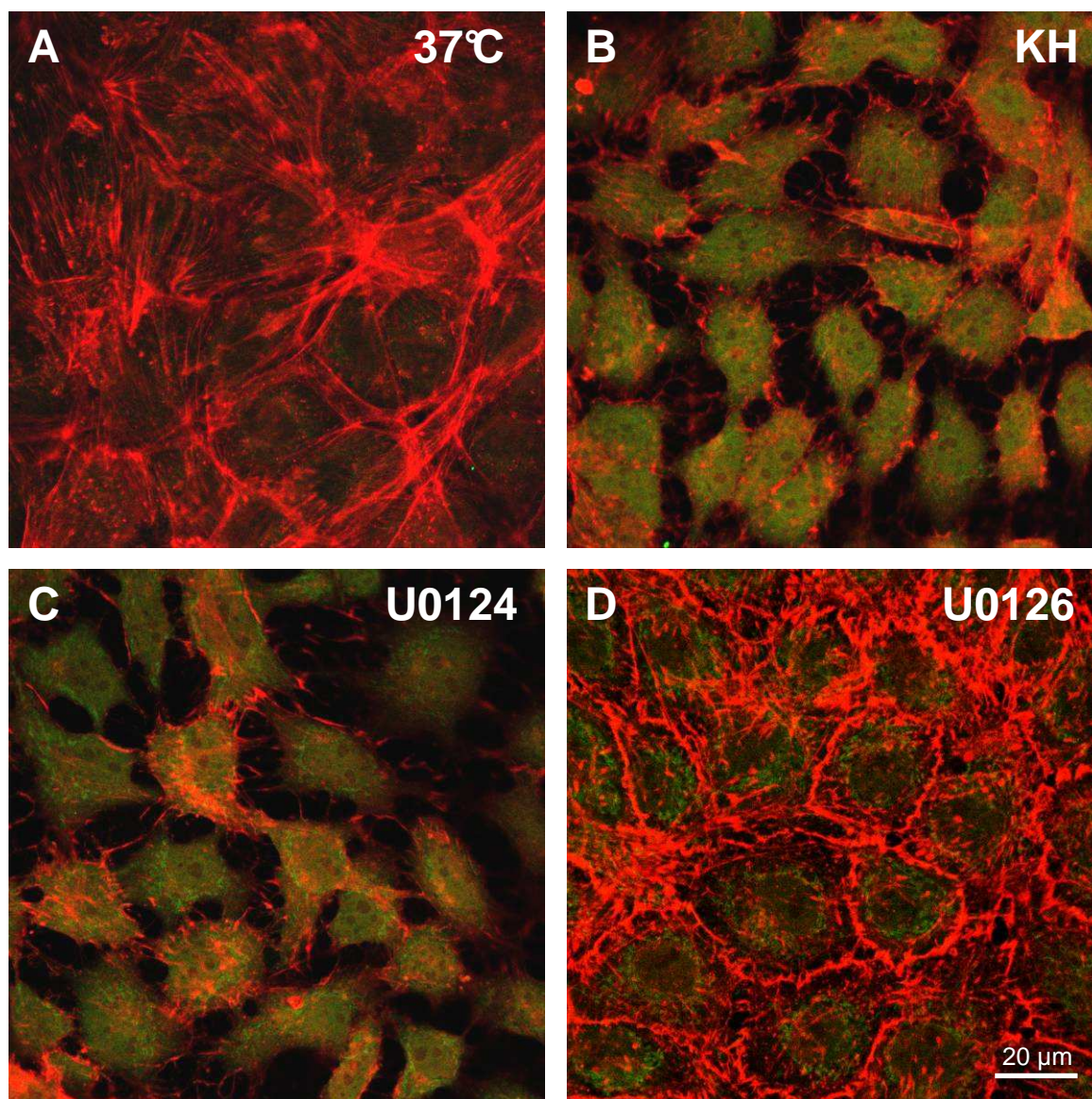
**Abb. 36: Effekt von p38-Inhibitoren auf die kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal (B) bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurden die p38-Inhibitoren SB203580 (10  $\mu$ M, C) oder SB202190 (10  $\mu$ M, D) zugesetzt. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie nach der Kaltinkubation untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

U0126 (10  $\mu$ M), ein Inhibitor von MEK (eine Kinase, die p44/42-MAPK aktiviert) hatte einen vergleichbaren Effekt auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts der Endothelzellen wie die p38-Inhibitoren (Abb. 37 D). Eine Inkubation mit der

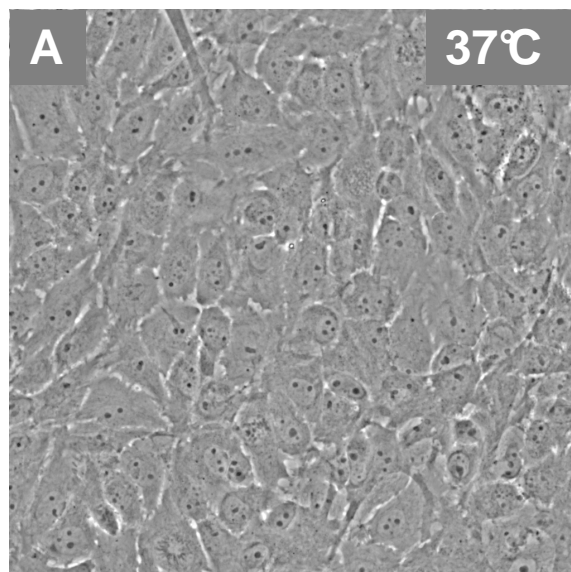


korrespondierenden Negativkontrolle U0124 konnte zeigen, dass es sich nicht um einen unspezifischen Effekt des Inhibitors handelt (Abb. 37 C).



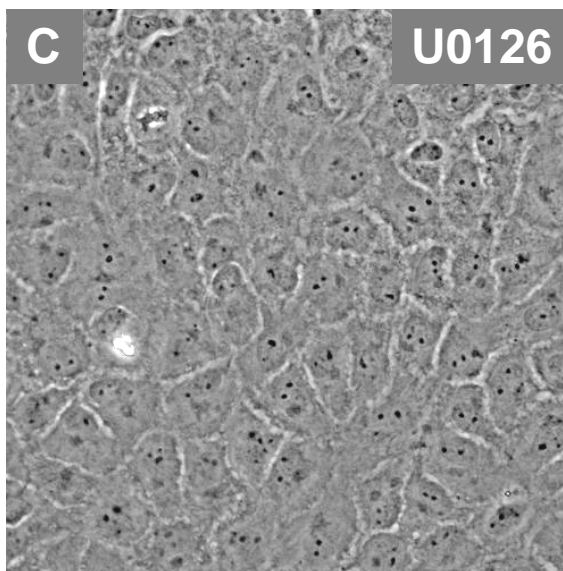
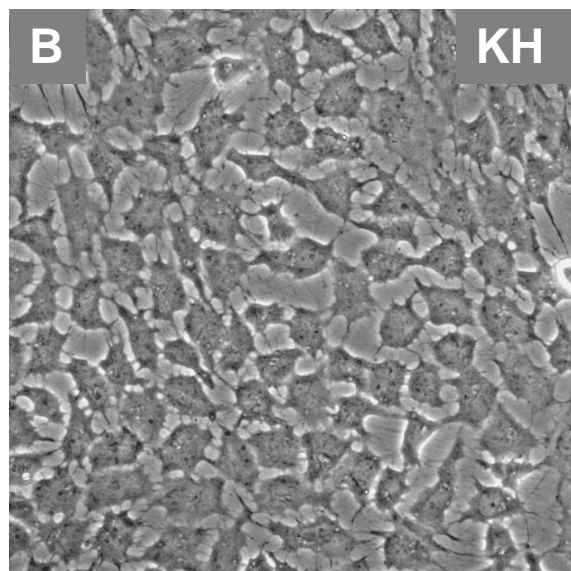
**Abb. 37: Effekt des MEK-Inhibitors U0126 auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde der MEK-Inhibitor U0126 (10 µM, D) bzw. dessen Negativkontrolle U0124 (10 µM, C) zugesetzt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton lysiert, anschließend F-Aktin mit TRITC-Phalloidin (rote Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) und G-Aktin mit Alexa Fluor-DNAse I (grüne Fluoreszenz,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ ) gefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



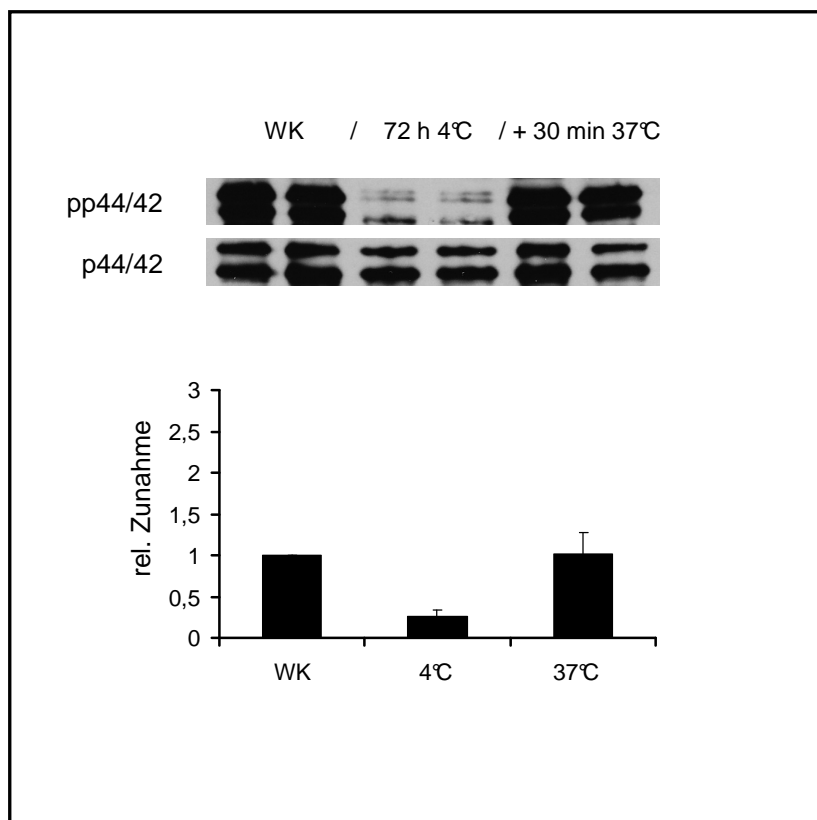
**Abb. 38: Effekt des MEK-Inhibitors U0126 auf die kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (B). Einem Teil der Ansätze wurde der MEK-Inhibitor U0126 (10 µM, C) zugesetzt. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie nach der Kaltinkubation untersucht (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



Auch auf die kälteinduzierten morphologischen Veränderungen hatte der MEK-Inhibitor U0126 einen ähnlichen Einfluss wie die p38-Inhibitoren. Das Zusammenziehen der Zellen und die Lückenbildung wurden inhibiert (Abb. 38 C).

Western Blots konnten jedoch keinen Anstieg der p44/42-Phosphorylierung in der Kälte zeigen. Stattdessen verringerte sich die p44/42-Phosphorylierung während der Kaltinkubation sogar, und stieg während der Wiedererwärmung auf das Niveau der Kontrollzellen an (Abb. 39).



**Abb. 39: Phosphorylierungsstatus von p44/42-MAPK während der Kaltinkubation.**

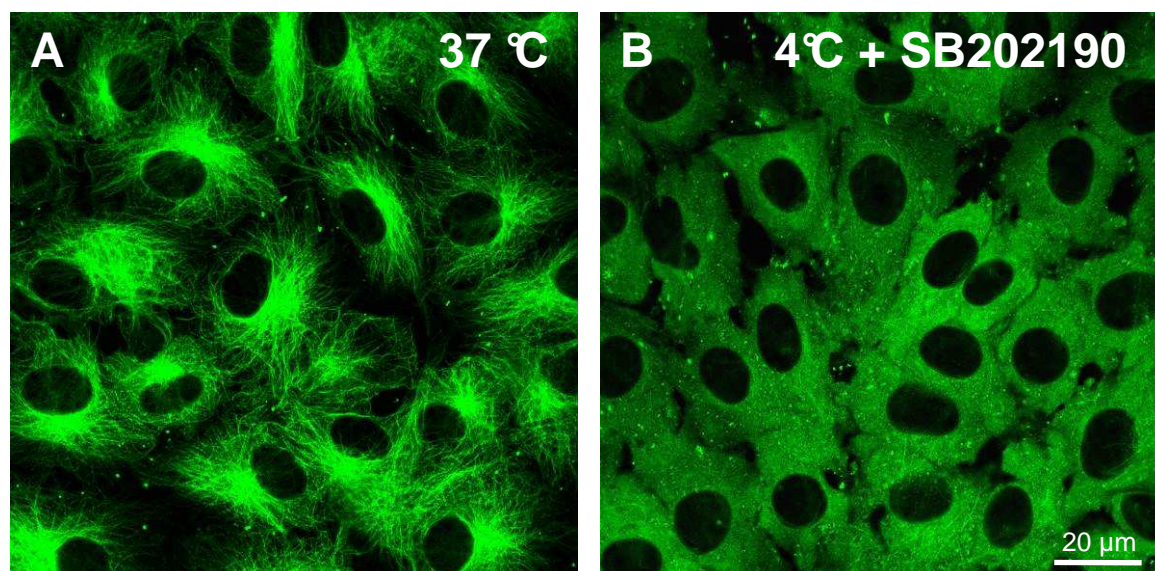
Kultivierte Schweineaorten-endothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C inkubiert und anschließend teilweise für 30 min auf 37°C wiedererwärmt.

Der Phosphorylierungsstatus von p44/42 wurde durch Western Blots mit dem korrespondierenden phosphospezifischen Antikörper festgestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch den Gesamtgehalt von p44/42 in den Zelllysaten sichergestellt. Abbildung repräsentativ für n=3 Versuche.

Um beurteilen zu können, ob der Effekt der MAP-Kinase-Inhibitoren und der Taxol-Effekt zusammenhängen, oder ob es sich um zwei getrennte Mechanismen handelt, mussten weitere Kontrollen durchgeführt werden. Abb. 40 B zeigt, dass der p38-Inhibitor SB202190 nicht in der Lage war, die Mikrotubuli während der Kaltinkubation zu stabilisieren. Der gleiche negative Befund wurde mit SB203580 und U0126 erzielt (nicht gezeigt).

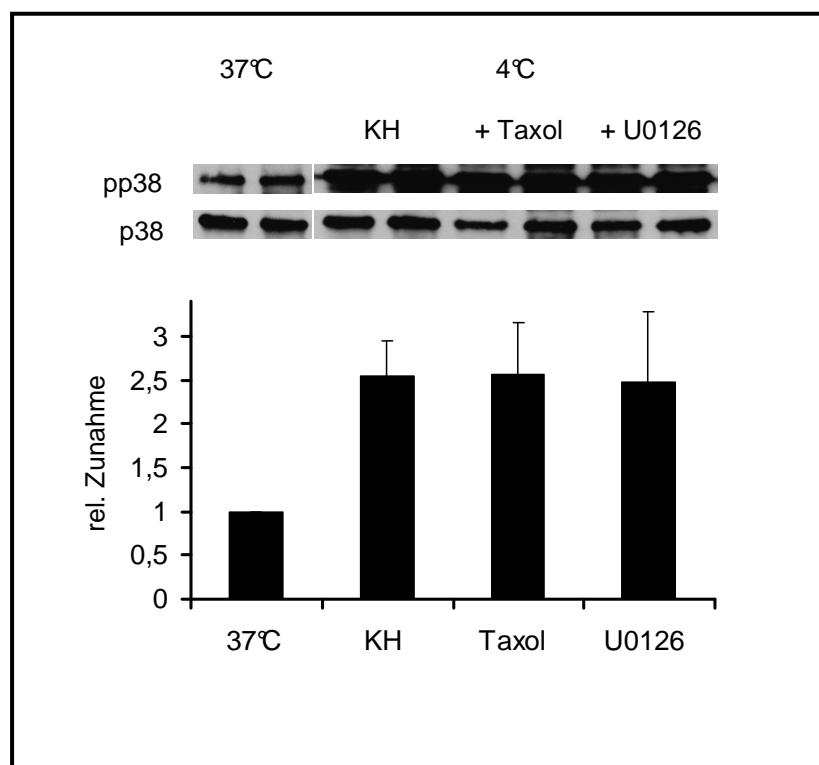
Andersherum hatten der Mikrotubuli-Stabilisator Taxol und der MEK-Inhibitor U0126 auch keinen Einfluss auf den Anstieg der p38-Phosphorylierung in der Kälte (Abb. 41).





**Abb. 40: Fehlender Effekt von SB202190 auf die kälteinduzierte Desintegration der Mikrotubuli von Schweineaortenendothelzellen.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (A) wurden für 120 min in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde der p38-Inhibitor SB202190 (10 µM; B) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton lysiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli immunhistochemisch mit einem monoklonalen Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 505-530 nm, Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.



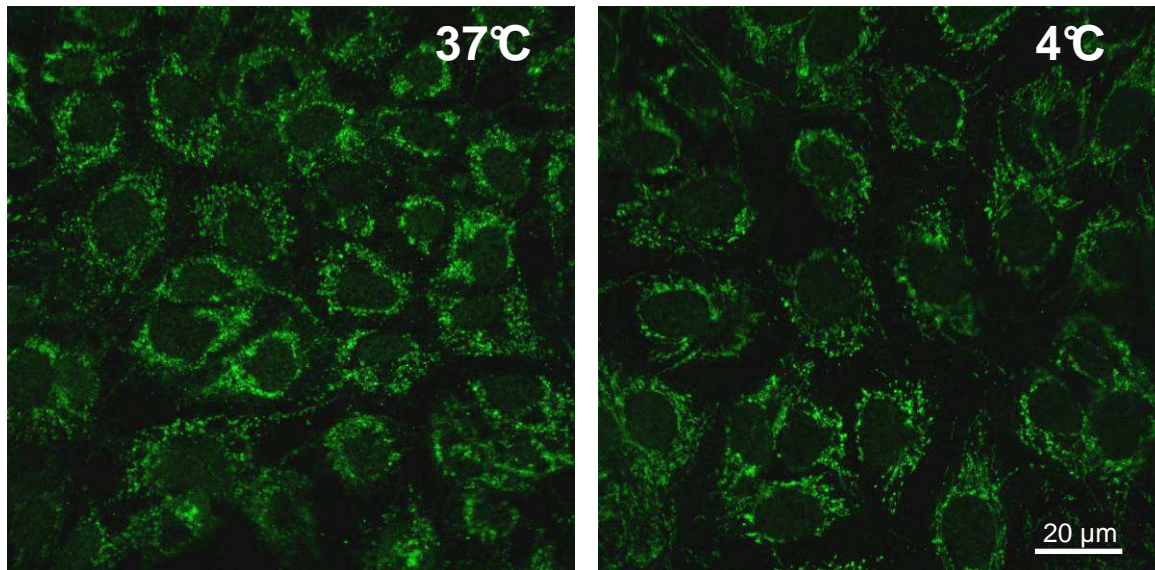
**Abb. 41: Fehlender Effekt von Taxol und U0126 auf die p38-Phosphorylierung während der Kaltinkubation.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C inkubiert und anschließend teilweise für 30 min auf 37°C wiedererwärmt. Einem Teil der Ansätze wurde der Mikrotubuli-Stabilisator Taxol (50 µM) oder der MEK-Inhibitor U0126 (10 µM) zugesetzt. Der Phosphorylierungsstatus von p38 wurde durch Western Blots mit dem korrespondierenden phospho-spezifischen Antikörper festgestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch den Gesamtgehalt von p38 in den Zellysaten sichergestellt. Abbildung repräsentativ für n=3 Versuche.



### 3.3.10. Effekt der Kaltinkubation auf die Umverteilung des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin

Das fokale Adhäsionsprotein Paxillin als Teil der Zell-Matrix-Verbindungen scheint nicht durch Hypothermie beeinflusst zu werden. Die Lokalisation entsprach nach einer 72-stündigen Kaltinkubation der Wärmekontrolle (Abb. 42).



**Abb. 42:** Auswirkung der Kaltinkubation auf die subzelluläre Verteilung des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin.

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 72 h in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton lysiert. Anschließend wurde Paxillin immunhistochemisch angefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ , Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

### 3.3.11. Umverteilung der junctionalen Proteine ZO-1 und VE-Cadherin in der Kälte

Endothelzellen werden durch verschiedene junctionale Protein-Komplexe zusammengehalten, welche die interzelluläre Permeabilität stark begrenzen. Die wichtigsten dafür zuständigen Protein-Komplexe sind die Adherens Junction und die Tight Junction. Deshalb wurde per Immunfluoreszenz bestimmt, wie sich eine Kaltinkubation auf die zelluläre Verteilung von ZO-1, einem Element der Tight Junction, und VE-Cadherin, einem Element der Adherens Junction auswirkt. Kontrollzellen zeigten gleichermaßen für ZO-1 und VE-Cadherin eine reguläre durchgehende Färbung an den Zellgrenzen (Abb. 43 A, B). Nach 72-stündiger

Kaltinkubation in KH-Puffer + Desferal war eine deutliche Störung der „Linien“ bzw. eine Umverteilung beider Proteine zu beobachten (Abb. 43 C, D). Die durchgehende linienartige Färbung wechselte in ein diskontinuierliches Muster. Diese Umverteilung konnte sowohl durch die Zugabe des p38-Inhibitors SB202190 (10  $\mu$ M, Abb. 43 E, F) als auch des Mikrotubuli-Stabilisators Taxol (50  $\mu$ M, nicht gezeigt) während der Kaltinkubation gehemmt werden.

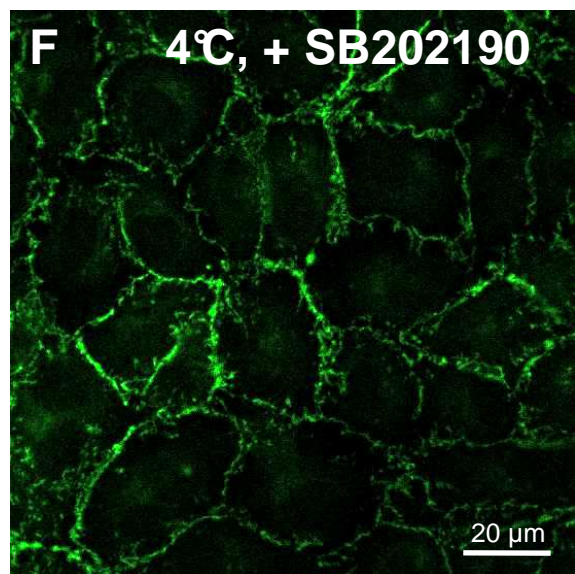
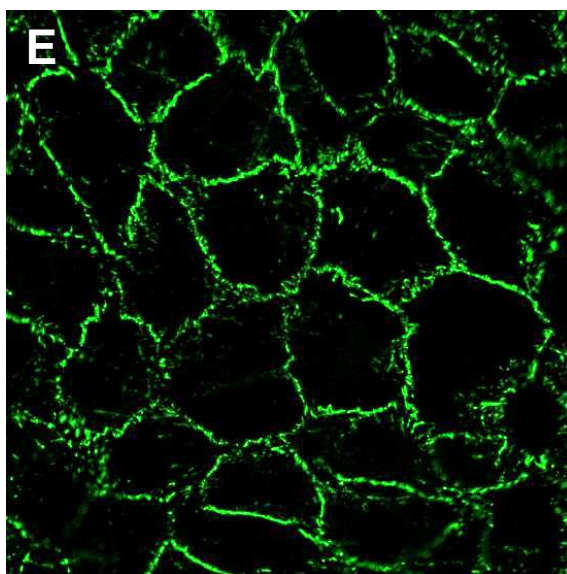
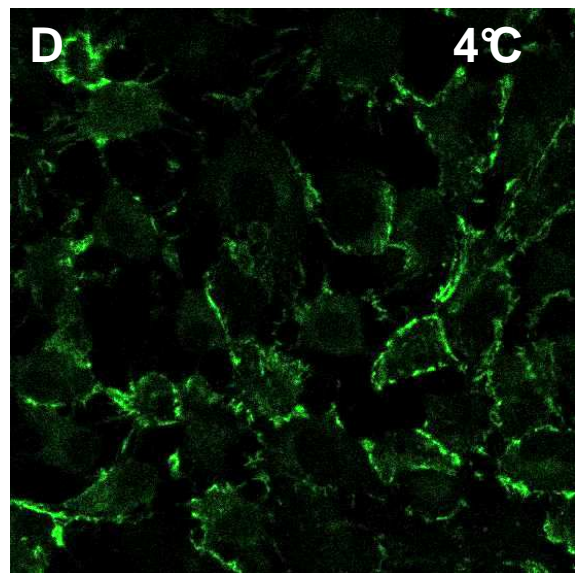
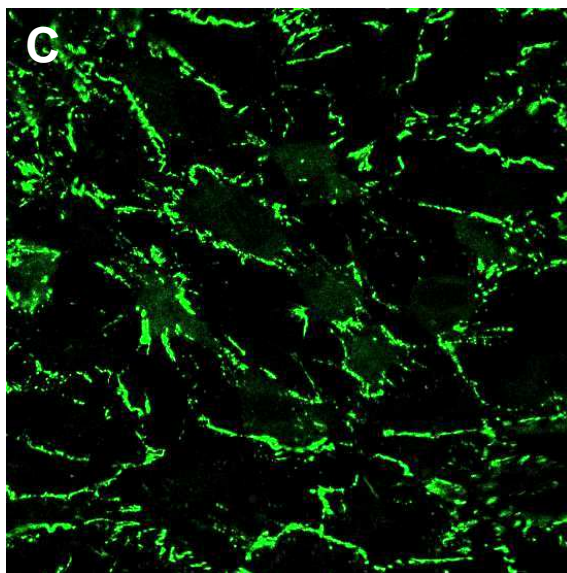
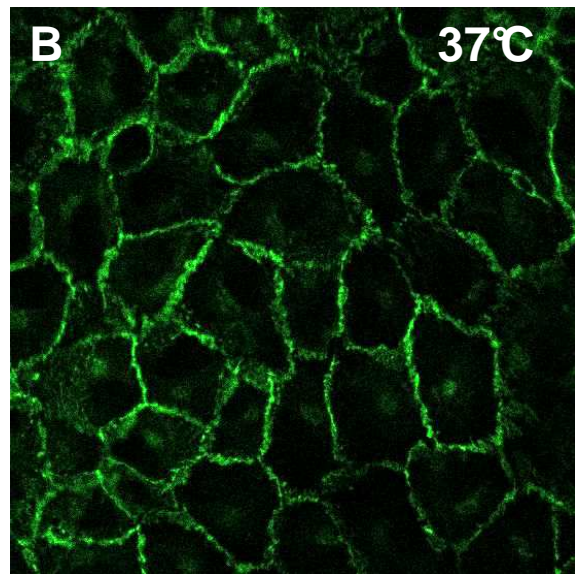
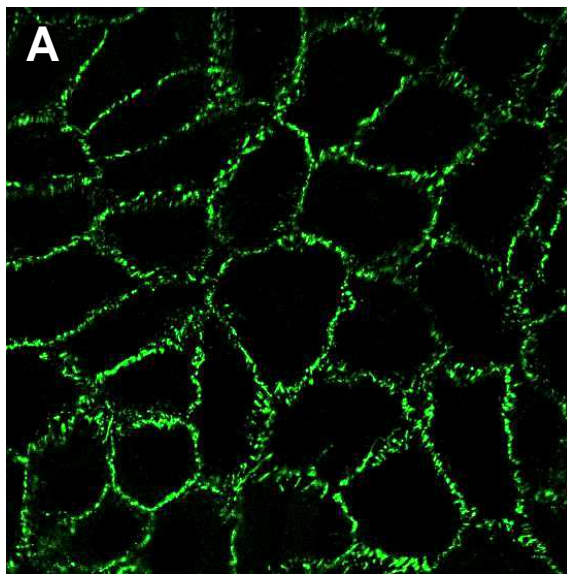
Wie der zusammenfassende Zeitverlauf (Abb. 44) zeigt, war die ZO-1-Färbung an den Zellrändern noch ähnlich ausgeprägt wie bei der Wärmekontrolle wenn bereits deutliche Lücken im Monolayer entstanden waren, und der kälteinduzierte Abbau von F-Aktin schon weit fortgeschritten war (nach 48 h Kaltinkubation). Erst nach 72 h Kaltinkubation war dann eine deutliche Umverteilung der junctionalen Proteine zu beobachten.

**Abb. 43: Umverteilung von ZO-1 und VE-Cadherin nach der Kaltinkubation.**

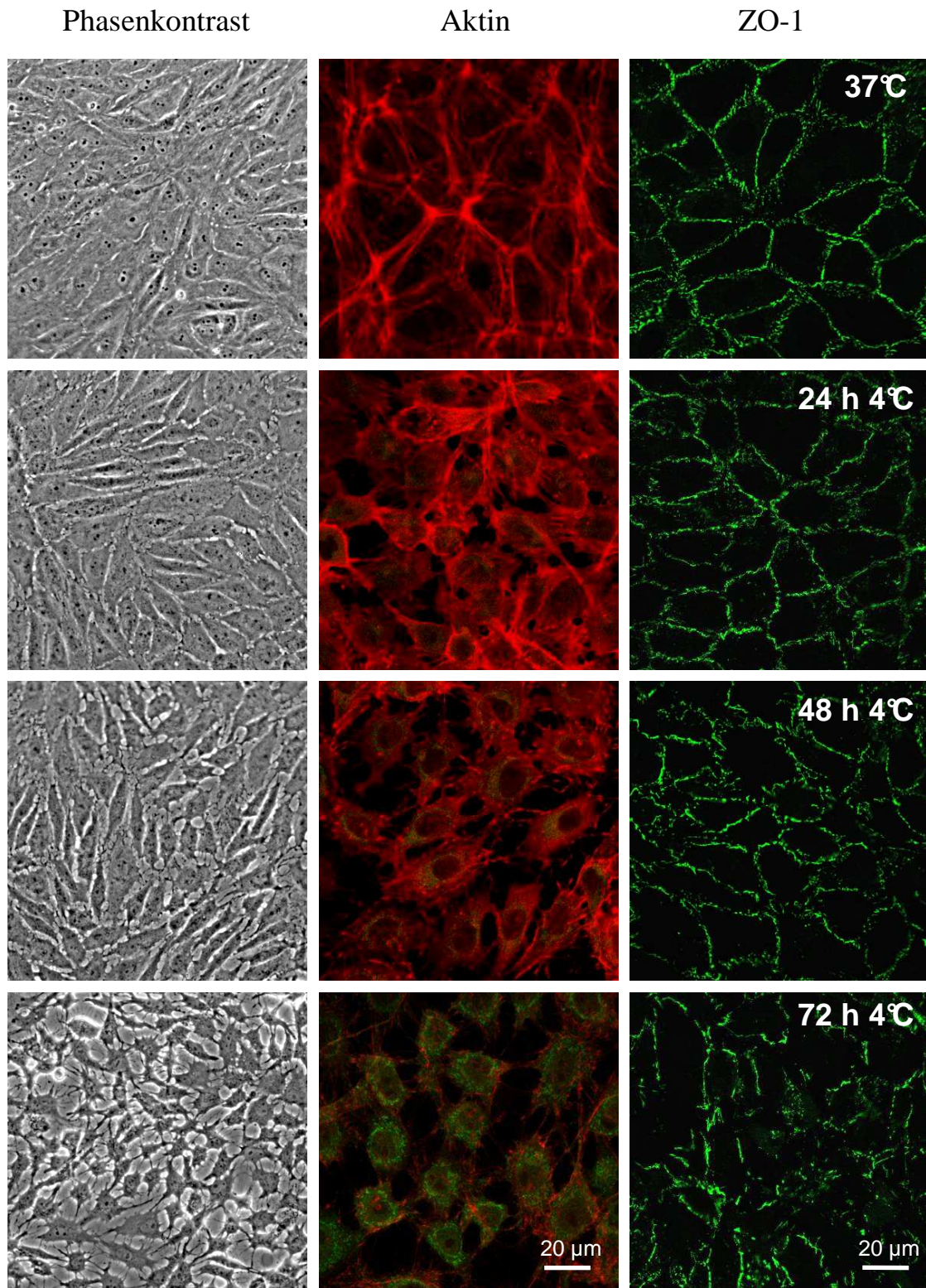
Kultivierte Schweineaortenendothelzellen (Kontrollen: A, B) wurden für 72 h in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert (C-F). Einem Teil der Ansätze wurde der p38-Inhibitor SB202190 (10  $\mu$ M, E, F) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton lysiert. Anschließend wurden die Proteine ZO-1 und VE-Cadherin immunhistochemisch mit entweder FITC-konjugiertem Anti-ZO-1-Antikörper (A, C, E) oder mit FITC-konjugiertem Anti-VE-Cadherin-Antikörper (B, D, F) angefärbt und durch Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 505-530 nm, Objektiv Plan Apochromat 63x). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

ZO - 1

VE - Cadherin







**Abb. 44: Zusammenfassender Zeitverlauf.**

Kultivierte Schweineaortenendothelzellen wurden für 24-72 Stunden in Krebs-Henseleit-Puffer + 1 mM Desferal bei 4°C inkubiert. Die Morphologie wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (Objektiv LD Plan-Neofluar 40x) und Aktin und ZO-1 durch Laser-Scanning-Mikroskopie (Objektiv Plan Apochromat 63x) nach der Kaltinkubation untersucht. Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.

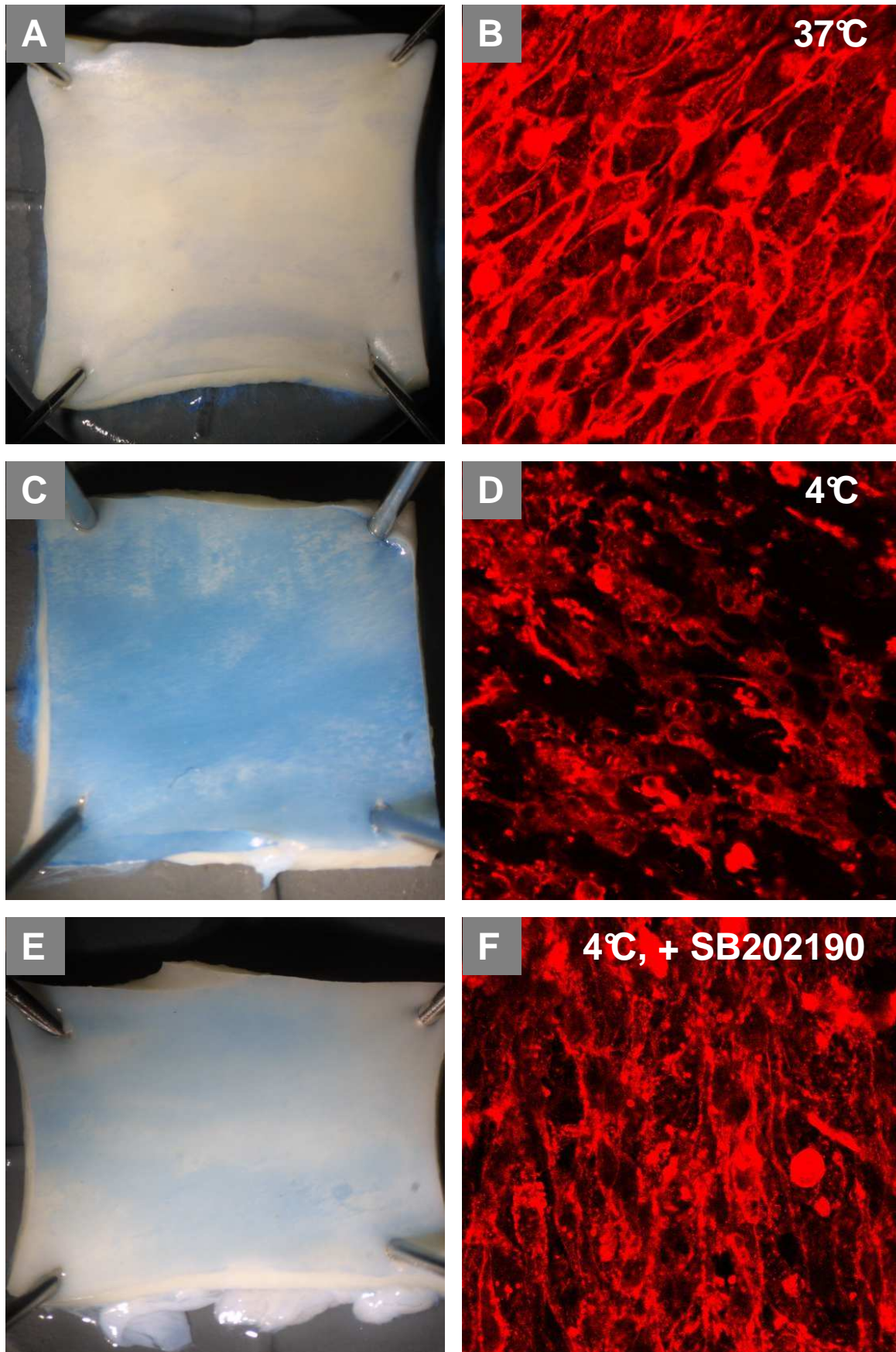
### 3.3.12. Beteiligung von p38-MAPK am kälteinduzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion im Gefäßmodell

Um zu überprüfen, ob p38-Inhibitoren einen vergleichbaren hemmenden Effekt auf die kälteinduzierte endotheliale Hyperpermeabilität in intakten Gefäßen wie in der Zellkultur haben, wurden Schweineaorten-Segmente bei 4°C kaltgelagert. Zur Bestimmung der endothelialen Permeabilität wurde die endotheliale Seite der Segmente Albumin-gebundenem Evans Blue ausgesetzt. Das subendotheliale Gewebe wurde in Kontroll-Segmenten nur leicht durch den Farbstoff angefärbt (Abb. 45 A). Nach einer einwöchigen Kaltinkubation in KH-Puffer + Desferal bei 4°C war die endotheliale Schrankenfunktion nicht mehr vorhanden und eine starke blaue Färbung wurde sichtbar (Abb. 45 C). Der p38-Inhibitor verstärkte die Barrierefunktion und verminderte die Färbung des subendothelialen Gewebes (Abb. 45 E). Diese Ergebnisse konnten durch eine Aktin-Färbung bestätigt werden. In Kontroll-Segmenten war deutlich ein starkes peripheres Aktinband zu beobachten (Abb. 45 B), während nach der Kaltinkubation genau wie im Zellkulturmodell das periphere Aktinband verloren ging und viele Lücken zu beobachten waren (Abb. 45 D). Wurde der p38-Inhibitor SB202190 (10 µM) während der Kaltinkubation zugesetzt, wurde diese Lückenbildung verhindert und das periphere Aktinband blieb weitgehend erhalten (Abb. 45 F). Damit scheint der p38-abhängige Mechanismus auch eine Rolle im Gefäßmodell zu spielen.

**Abb. 45: Untersuchungen an Schweineaorten-Segmenten.**

Schweineaorten-Segmente (Kontrollen: A, B) wurden für sieben Tage in Krebs-Henseleit-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C gelagert (C, D). Einige Segmente wurden zusätzlich mit dem p38-Inhibitor SB202190 (10 µM) behandelt (E, F). Zur Bestimmung der endothelialen Permeabilität dieser Segmente wurde die endotheliale Seite der Segmente Albumin-gebundenem Evans Blue ausgesetzt (A, C, E). Zur F-Aktin-Färbung mit TRITC-Phalloidin ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ ) wurden die Segmente direkt nach der Kälte fixiert (B, D, F). Abbildungen repräsentativ für n=4 Versuche.







## 4. Diskussion

### 4.1. Lysosomen als mögliche Quelle des kälteinduzierten Anstiegs des cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools

Der lysosomale Eisenpool primärer Rattenhepatozyten wurde in dieser Arbeit mittels quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie und der eisenabhängigen lysosomalen Fluoreszenzsonde BDA zunächst unter Standardbedingungen bei 37°C und anschließend während der Kaltinkubation bei 4°C bestimmt.

Der fehlende Fluoreszenzanstieg nach der Zugabe des Eisenchelators Desferal zu mit BDA beladenen Kontrollzellen (Abb. 11) zeigt, dass in den sauren Organellen der Hepatozyten unter Standardbedingungen kein größerer chelatisierbarer Eisenpool vorhanden ist. Die Funktionsfähigkeit der Fluoreszenzsonde konnte zuvor mit einer experimentell induzierten Erhöhung des intrazellulären Eisenspiegels durch den lipophilen Eisen-(III)-bis-(8-Hydroxychinolin)-Komplex und eine anschließende Entquenchung mit Desferal gezeigt werden (Springer, Knoop, Rauen, unveröffentlicht). Damit konnte hier der nach bisherigem Stand der Wissenschaft völlig unerwartete Befund, den A. Springer an Leberendothelzellen gezeigt hatte, bestätigt werden (Springer, Knoop, Rauen, unveröffentlicht).

Dass vorangegangene Arbeiten, in welchen intrazellulär kompartimentiertes chelatisierbares Eisen gemessen wurde, zu einem anderen Ergebnis gekommen sind, liegt wahrscheinlich an methodischen Unzulänglichkeiten. Dort wurden die unspezifischeren Fluoreszenzsonden Calcein-AM (49,149) und Phen Green SK (110-113) verwendet. Calcein-AM wird als lipophiler Ester in die Zelle aufgenommen und cytosolisch durch unspezifische Esterasen gespalten. Sollte einiges Calcein-AM den cytosolischen Esterasen entweichen und erst in den Lysosomen durch lysosomale saure Esterasen gespalten werden, könnte Calcein bei  $\text{pH} < 5$  Eisen dennoch nicht signifikant chelatisieren (150). Die Calcein-AM-Methode erfasst damit wahrscheinlich nicht das lysosomale chelatisierbare Eisen (113,171,150). Auch die Phen Green SK-Methode weist Schwächen auf. Der frühere Nachweis eines lysosomalen/endosomalen Pools chelatisierbaren Eisens (111) könnte auf eine Kompartimentierung eines Teils des cytosolisch gebildeten Phen Green SK-Eisen-Komplexes in den Lysosomen durch eine längere Inkubationszeit zurückzuführen sein. Außerdem unterliegt auch die Phen Green SK-Fluoreszenz einer starken pH-Abhängigkeit (68). Die cytochemische Silbersulfid-Methode (80), die nur in fixierten Zellen Verwendung findet, ist

ebenso nur eingeschränkt zur Bestimmung lysosomalen chelatisierbaren Eisens geeignet. Es ist nicht gesichert, ob diese Methode chelatisierbares Eisen darstellt, oder zusätzlich auch ursprünglich fest (Protein-) gebundenes Eisen detektiert. Einige publizierte Ergebnisse zur Wichtigkeit des lysosomalen Eisens bei Zellschädigungsprozessen beruhen auf der Annahme, dass Desferal ausschließlich über Endocytose aufgenommen wird, und damit hauptsächlich in den Lysosomen vorliegt (79,80). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen aber den Schluss zu, dass Desferal in großem Maße cytosolisch vorliegt, und von dort eine eisenabhängige Zellschädigung beeinflusst (112).

Im Weiteren konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass es in der Kälte zu einem Anstieg des lysosomalen chelatisierbaren Eisenpools kommt. Ein Eisenanstieg in den Lysosomen konnte bisher bereits unter oxidativem Stress (102) und Nährstoffmangel (103) gezeigt werden. Die dort angewandten Methoden lassen aber keine quantitative Aussage zu, und es ist nicht sicher, ob nicht das gesamte lysosomale Eisen statt des chelatisierbaren Eisens bestimmt wurde (111). Wie für den Anstieg des cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools beschrieben (123) findet auch der hier gezeigte Anstieg des lysosomalen chelatisierbaren Eisens zu einem frühen Zeitpunkt der Kaltinkubation statt (3 h 4°C). Bei einem in dieser Arbeit gezeigten Anstieg des lysosomalen chelatisierbaren Eisens in der Kälte von ca. 1,7 µM und einem Anteil der Lysosomen am Zellvolumen von nur 1 % (24), verglichen mit einem Anstieg des cytosolischen chelatisierbaren Eisens um ca. 4,6 µM (123) und einem Anteil des Cytosols am Zellvolumen von 54 % (24) kann der cytosolische Anstieg aber nicht ausschließlich durch lysosomales Eisen erklärt werden. Der komplette Übergang des lysosomalen chelatisierbaren Eisens in das Cytosol würde damit nur zu weniger als einem Prozent zum Anstieg des cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools beitragen können. Eine Unterbestimmung des lysosomalen chelatisierbaren Eisens während der Messungen ist eher unwahrscheinlich, da die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse genau wie andere Versuche (4) zeigen, dass die lysosomale Integrität erst zu einem späteren Zeitpunkt der Kaltinkubation verloren geht, und chelatisierbares Eisen somit nicht über ein Auslecken aus den Lysosomen ins Cytosol unterbestimmt werden kann. Auch ein Transport von Eisen über die Membran ins Cytosol ist unwahrscheinlich, da Eisen in den Lysosomen an den Chelator BDA gebunden vorliegt. Somit können die Lysosomen zwar zu einem Anstieg beitragen, aber als Hauptquelle des in der Kälte ansteigenden chelatisierbaren Eisenpools weitgehend ausgeschlossen werden. Ferner konnte unabhängig von dieser Arbeit kein Schutzeffekt durch das, neben seiner Eigenschaft als Fluoreszenzsonde, auch als lysosomaler Eisenchelator fungierende BDA auf

die kälteinduzierte Zellschädigung festgestellt werden (Rauen, unveröffentlicht), was ebenfalls gegen eine Beteiligung lysosomalen Eisens an der eisenabhängigen Zellschädigung des Hepatozyten spricht. Wenn die Lysosomen nicht die Quelle chelatisierbaren Eisens in der Kälte sind, muss über alternative Quellen diskutiert werden. Als weitere mögliche Quelle chelatisierbaren Eisens wurden Ferritin (172) und Cytochrom P-450 (63) vorgeschlagen. Sowohl an isoliertem Ferritin als auch in der cytosolischen Fraktion homogenisierter Rattenleber konnte bisher keine kälteinduzierte Eisenfreisetzung gezeigt werden (Homann, Rauen, unveröffentlicht). Es ist jedoch möglich, dass die Freisetzung nur in einer intakten Zelle stattfindet. Die Befunde von Huang et al. (63) zu Cytochrom P-450 als denkbare Quelle chelatisierbaren Eisens scheinen fragwürdig, da die gezeigten Effekte durch eine sehr hohe Konzentration lipophiler Hemmstoffe (Cimetidin, Piperonylbutoxid) hervorgerufen wurden, in der die Spezifität der Hemmstoffe zu bezweifeln ist.

Der chelatisierbare Eisenpool ist auch unter physiologischen Bedingungen noch unzureichend erforscht (173), was eine Beschreibung in pathologischen Zuständen (Kälte) noch schwieriger macht. Die Vielzahl intrazellulärer Liganden für Eisenionen, die Möglichkeit des an Makromoleküle assoziierten Eisens (Homann, Rauen, unveröffentlicht) und die subzelluläre Kompartimentierung (111), die erst seit ca. 10 Jahren bekannt ist, machen es weiterhin schwer den chelatisierbaren Eisenpool, dessen bloße Existenz bis Ende letzten Jahrhunderts noch nicht belegt war, zu lokalisieren und zu quantifizieren. Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass die speziell für Eisenmessungen in sauren Organellen entwickelte Fluoreszenzsonde BDA auch unter pathologischen Bedingungen quantitative Messungen ermöglicht und BDA helfen kann, den Beitrag intralysosomalen chelatisierbaren Eisens zum intrazellulären chelatisierbaren Eisenpools aufzuklären.

#### **4.2. Lysosomale Komponente der kälteinduzierten Zellschädigung**

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine Kaltlagerung in ‚physiologischen‘ Medien zu einem ausgeprägten Verlust der Lysosomen-Integrität führt, und diese Schädigung der Lysosomen überraschenderweise über zwei weitgehend voneinander unabhängige Mechanismen verläuft: erstens eisenabhängig und zweitens Cathepsin B-abhängig.

Die Schädigung der Lysosomen, die hier über eine fehlende Anreicherung des lysosomalen Fluoreszenzindikators LysoTracker Red gezeigt wurde, verläuft demnach entgegen der

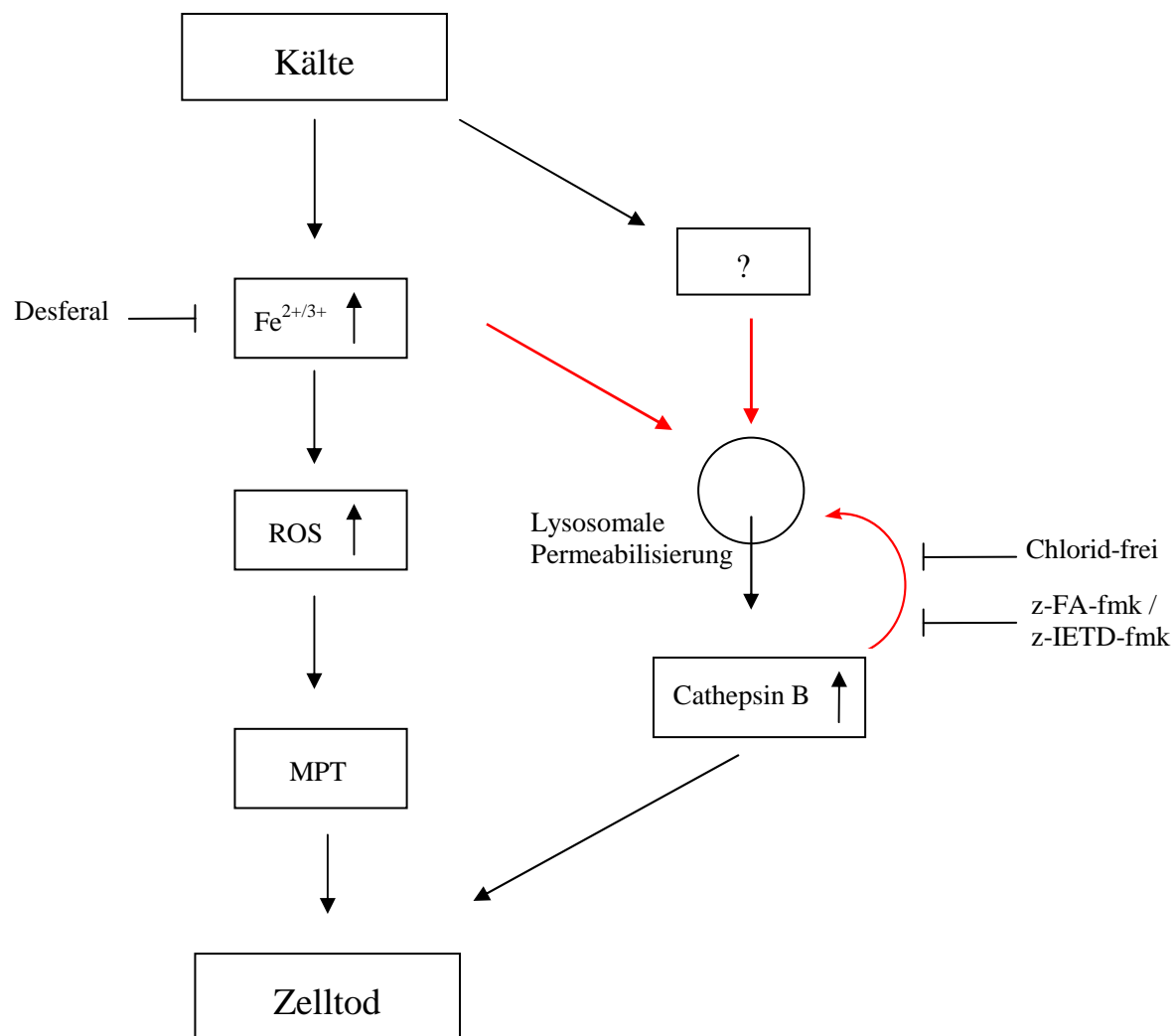
Arbeitshypothese (Abb. 3) partiell eisenabhängig und kann durch die Zugabe eines Eisenchelators verringert werden (Abb. 46). Diese eisenabhängige Schädigung der Lysosomen konnte inzwischen von Arthur et al. bestätigt werden (4). Ein großer Anteil der kälteinduzierten Permeabilisierung der Lysosomen wird jedoch auch über einen eisenunabhängigen, Cathepsin B-abhängigen Mechanismus vermittelt. Damit greift der zuvor gezeigte Schutzeffekt des Cathepsin B-Inhibitors z-FA-fmk auf die Zellvitalität nicht wie vor dieser Arbeit vermutet im Anschluss an eine Lysosomen-Permeabilisierung, sondern verhindert überraschenderweise genau diese (Abb. 46). Möglicherweise wird die Lysosomenmembran bereits von innen durch Cathepsin B geschädigt, möglicherweise durch ein Clustern der stark glykosylierten Proteine der Membran in der Kälte zum Beispiel durch den temperaturbedingten Phasenübergang der Membran. Der genaue Weg, wie es zu einer eisenunabhängigen Permeabilisierung der Lysosomen kommt, ist jedoch noch unbekannt. Zwar konnte hier ein partieller Schutzeffekt des Caspase 8-Inhibitors z-IETD-fmk auf die lysosomale Permeabilisierung gezeigt werden, eine Aktivierung von Caspase 8 in der Kälte war aber nicht zu beobachten (Li, Rauen, unveröffentlicht). Andere Befunde haben jedoch in der Zwischenzeit gezeigt, dass der Caspase 8-Inhibitor z-IETD-fmk ebenfalls Cathepsin B hemmt (Li, Rauen, unveröffentlicht) und wahrscheinlich auf diesem Weg vor der in dieser Arbeit gezeigten Permeabilisierung der Lysosomen und einer Zellschädigung schützt.

Als ein wichtiger Befund konnte hier gezeigt werden, dass die eisenunabhängige, Cathepsin B-vermittelte Schädigung der Lysosomen in chloridfreiem Medium deutlich vermindert auftrat. Die Lysosomen-Integrität blieb in KH-Puffer, in welchem die Chlorid-Ionen durch Lactobionat ersetzt wurden, deutlich länger erhalten (Abb. 15). Damit wäre eine chloridfreie Konservierungslösung die vermeintlich einfachste Methode, diesen Weg der Zellschädigung zu vermeiden. Als Grund für die Chloridabhängigkeit der Schädigung wäre eine Beeinflussung des cytosolischen pH-Wertes über eine Hemmung des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters denkbar. Die daraufhin erfolgende Alkalisierung des Cytosols könnte die Aktivität von Cathepsin B, das sein pH-Optimum bei pH 6 hat (163), vermindern. Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurden unabhängig von dieser Arbeit weitere mechanistische Untersuchungen durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass die chloridabhängige Komponente durch keinen Chloridkanal / -transporter-Hemmstoff zu beeinflussen war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Schutzeffekt bei einem Chloridersatz durch Lactobionat oder Aspartat auftritt, nicht jedoch bei einem Austausch von Chlorid gegen



Bromid (Li, Rauen, unveröffentlicht). Möglicherweise handelt es sich daher hierbei nur um einen extrazellulären Effekt/unspezifischen Membraneffekt (Rezeptor-Clustering?).

Im Laufe dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass diese in Rattenhepatozyten gezeigte eisenunabhängige, durch Cathepsin B vermittelte Kälteschädigung in keinem anderen der in der Arbeitsgruppe untersuchten Zelltypen auftritt (auch nicht in humanen Hepatozyten (116)), was den Nutzen dieser Befunde für den klinischen Alltag vermindert. Daher wurde der weiteren Aufklärung des Schädigungsweges keine Priorität eingeräumt.



**Abb. 46: Mechanismus der Lysosomen-abhängigen Kälteschädigung primärer Rattenhepatozyten.**

Neue Befunde dieser Arbeit (rote Pfeile) im Vergleich zur Arbeitshypothese (Abbildung 3). Einzelheiten siehe Text. Durch Kälte werden in primären Rattenhepatozyten zwei Hauptschädigungswege ausgelöst. Eine eisenabhängige Schädigung, die über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und einen nachfolgenden mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) vermittelt wird und eine eisenunabhängige Schädigung, die über eine lysosomale Permeabilisierung und Cathepsin B vermittelt wird.

#### **4.3. Kälteinduzierter Verlust der endothelialen Schrankenfunktion**

Im dritten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der Kälte zu massiven, von einer eisenabhängigen Zellschädigung unabhängigen Veränderungen des Cytoskeletts kommt und diese mit einem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion einhergehen. Diese Veränderungen verlaufen nach einem komplexen p38-, Mikrotubuli- und (nur untergeordnet) HSP90-abhängigen Mechanismus.

##### *Eisenabhängige Zellschädigung vs. eisenunabhängige morphologische Veränderungen*

Wie Rauen et al. und andere zeigen konnten, ist eine kälteinduzierte Zellschädigung in den meisten Zelltypen eisenabhängig, und speziell Endothelzellen reagieren besonders empfindlich auf Kälte (70,124). Diese eisenabhängige Kälteschädigung konnte hier effektiv durch den Zusatz eines membrangängigen Eisenchelators inhibiert werden.

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Lückenbildung im endothelialen Monolayer und ein Abbau von Cytoskelett-Elementen unabhängig von einer kälteinduzierten Zellschädigung auftritt, und morphologische Veränderungen wie die starke Kontraktion der Zellen in der Kälte durch den Zusatz eines Eisenchelators sogar eher noch verstärkt werden (Abb. 17). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die kälteinduzierten Veränderungen der Zellmorphologie und des Cytoskeletts während einer nachfolgenden Wiedererwärmung vollständig reversibel sind, wenn die Zellen während der Kaltinkubation mit dem Eisenchelator Desferal geschützt wurden (Abb. 19). Obwohl die eisenunabhängigen morphologischen Veränderungen vollständig reversibel sind, sind sie wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für eine Schädigung des Transplantats. Ein Verlust der endothelialen Schrankenfunktion in diesem Ausmaß bedeutet, dass die Blutgefäße zum Zeitpunkt der Reperfusion undicht sind, und Blutbestandteile ins umliegende Gewebe eindringen können. Außerdem scheinen die ersten Minuten der Reperfusion auch von besonderer Bedeutung für die Manifestation einer Graft-Schädigung zu sein (117), da in ihrer Entwicklung die Leukozyten- und Thrombozyten-Akkumulation und Adhärenz, die durch die Retraktion der Zellen und einem damit verbundenen Freilegen des subendothelialen Gewebes stark begünstigt ist, eine wichtige Rolle spielen (140,148).

Der von Brinkkoetter et al. gezeigte kälteinduzierte Verlust der endothelialen Schrankenfunktion ist ebenfalls reversibel, wenn die Zellen durch eine Vorbehandlung mit Dopamin vor einer Kälteschädigung geschützt werden (23). Die Lückenbildung in der Kälte wird jedoch auch hier nicht verhindert. Die von Trocha et al. gezeigte Permeabilitätssteigerung an endothelialen Monolayern tritt hingegen erst nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung auf und ist eher Ausdruck einer irreversiblen Schädigung des Endothels denn einer reversiblen morphologischen Veränderung (152).

### *Klassische Wege einer endothelialen Permeabilitätssteigerung*

Um den Mechanismus des eisenunabhängigen kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Schrankenfunktion aufzuklären, wurden zunächst die klassischen Wege einer endothelialen Permeabilitätssteigerung, wie sie z.B. bei Entzündungsreaktionen auftreten, untersucht.

In dieser Arbeit konnte kein Hinweis auf eine Beteiligung des Rho-ROCK-Signalweges an den kälteinduzierten Veränderungen des Cytoskeletts und der endothelialen Schrankenfunktion gefunden werden, welcher z.B. eine bedeutende Rolle in einer Thrombin-induzierten endothelialen Dysfunktion spielt (15). Die über Rho aktivierte Rho-Kinase inhibiert die MLC-Phosphatase und führt damit zu einem Anstieg von phosphoryliertem MLC (15). Dies führt wiederum zu einer gesteigerten Stressfaserbildung, verstärkter Aktomyosin-Aktivität und damit zu einer gesteigerten Permeabilität (15,160). Damit spricht der massive Abbau von F-Aktin zu G-Aktin in der Kälte generell eigentlich gegen eine aktive Rho-initiierte Endothelzell-Kontraktion. Die eingesetzten Inhibitoren zeigten in der Kälte auch keinen Effekt (Abb. 24). Rho kann aber andererseits auch über eine Aktivierung von LIMK zu einer Phosphorylierung von Cofilin führen (50). Eine Phosphorylierung von Cofilin führt zu einer verminderten Cofilin-Aktivität und damit zu einer Aktin-Stabilisierung. Daher wurde versucht die Phosphatase-Inhibitoren Natriumorthovanadat, Cantharidin und Okadasäure zur Aktin-Stabilisierung einzusetzen. Knapp et al. zeigten bereits 1999 einen konzentrationsabhängigen Einfluss von Cantharidin auf die endotheliale Permeabilität (75). Die Phosphatase-Inhibitoren konnten jedoch nicht zu einer Aktin-Stabilisierung in der Kälte beitragen (Abb. 26). Man muss in diesem Zusammenhang jedoch bedenken, dass der Phosphorylierungsstatus aller regulativen Proteine beeinflusst wird und es in der Zelle ein empfindliches Zusammenspiel vieler Phosphatasen und Kinasen gibt.

Auch für viele andere in der Literatur diskutierte Signalwege wie cAMP (9) oder ein Energiedefizit (77) konnte keine Beteiligung an den kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie und des Cytoskeletts gezeigt werden (Abb. 23 und 25). Forskolin als cAMP-Aktivator hatte keinen Einfluss auf die kälteinduzierte Permeabilitätserhöhung. Es wurde jedoch auch zuvor gezeigt, dass cAMP die endotheliale Schrankenfunktion je nach Herkunft der Endothelzellen stabilisieren oder destabilisieren kann (9).

#### *HSP90-abhängige Veränderung des Aktin-Cytoskeletts*

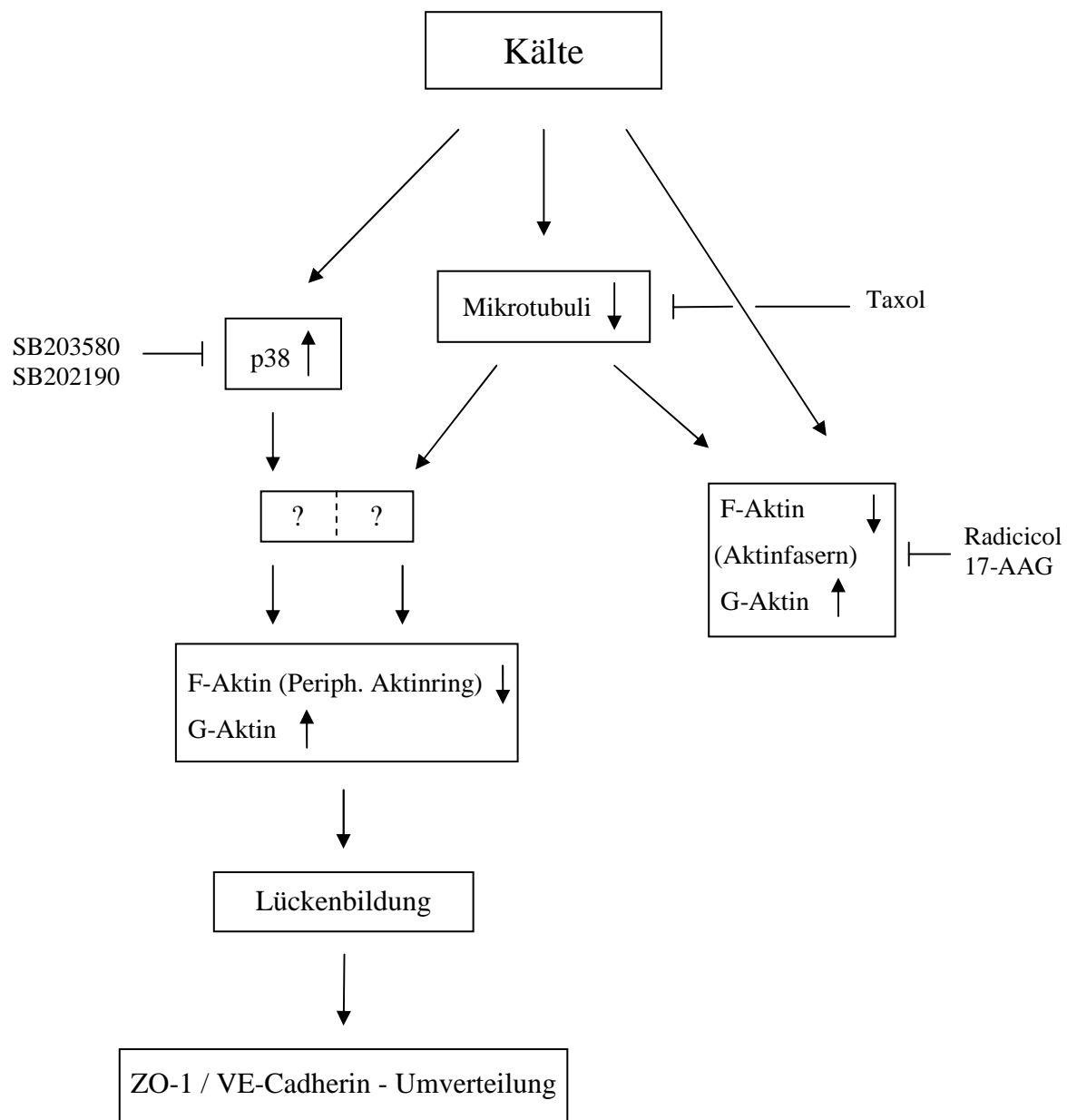
In dem in dieser Arbeit eingesetzten Modell konnte ein untergeordneter Effekt der HSP90-Inhibitoren Radicicol und 17-AAG auf die kälteinduzierten Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts beobachtet werden (Abb. 47). Die Inhibitoren hatten zwar weder Einfluss auf den Erhalt der Monolayer-Integrität in der Kälte, noch auf den Erhalt des peripheren Aktinrings, im Gegensatz zur Kaltinkubation in KH-Puffer mit Desferal wurden durch die HSP90-Inhibitoren jedoch etliche Aktinfasern erhalten (Abb. 29, 30).

Es ist bekannt, dass das Cytoskelett in die Regulation der endothelialen Schrankenfunktion involviert ist, insbesondere das Aktin-Cytoskelett mit den für die Zellform verantwortlichen Aktinfasern und dem dichten peripheren Aktinring (165). So konnten Antonov et al. einen protektiven Effekt des HSP90-Inhibitors Radicicol auf eine TGF- $\beta$ -induzierte endotheliale Hyperpermeabilität zeigen, welcher auf einer Stabilisierung des Aktin-Cytoskeletts und verminderter MLC-Phosphorylierung beruhte (3). Chatterjee et al. konnten im Gegensatz zum kälteinduzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion für eine LPS-induzierte endotheliale Hyperpermeabilität ebenfalls einen protektiven Effekt von HSP90-Inhibitoren zeigen (28).

#### *Kälteinduzierter Abbau der Mikrotubuli und seine Auswirkung auf das Aktin-Cytoskelett*

In der Kälte kommt es zu einem kompletten Abbau der Mikrotubuli. Übereinstimmend mit Suzuki et al. konnte gezeigt werden, dass es in der Kälte zu einem sehr schnellen Abbau der Mikrotubuli kommt und dass der Einsatz des Mikrotubuli-Stabilisators Taxol während der Kaltinkubation zu einem Erhalt des feinen Mikrotubuli-Netzwerkes führt (147; Abb. 31).





**Abb. 47: Hypothetischer Mechanismus eines kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Schrankenfunktion.**

Die kälteinduzierten eisenunabhängigen Veränderungen an Schweineaortenendothelzellen verlaufen über einen p38-, Mikrotubuli- und HSP90-abhängigen Mechanismus. In der Folge einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase und durch eine Desintegration der Mikrotubuli kommt es zu einem Aktinabbau und in dessen Folge zu einer Lückenbildung im endothelialen Monolayer. Dies wiederum führt zu einer Umverteilung der junctionalen Proteine ZO-1 und VE-Cadherin. Ein paralleler Signalweg führt zu einem HSP-90-abhängigen Abbau von Aktinfasern. Einzelheiten siehe Text.

Die unterschiedlichen Taxol-Konzentrationen, die im Vergleich zu Suzuki et al. in dieser Arbeit benötigt wurden, lassen sich vermutlich über die verschiedenen Zelltypen erklären.

Überraschenderweise bewirkte Taxol hier jedoch gleichzeitig auch eine Stabilisierung des Aktin-Cytoskeletts (Abb. 32). Sowohl der periphere Aktinring als auch einige Aktinfasern blieben während einer Kaltinkubation unter Zusatz von Taxol erhalten. Zusätzlich wurde auch die Lückenbildung komplett verhindert und die endotheliale Schrankenfunktion blieb somit in der Kälte erhalten.

Für lange Zeit wurden die Mikrotubuli und das Aktin-Cytoskelett ausschließlich als eigenständige Gebilde gesehen. Heute denkt man anders darüber (43). Die Organisation von Aktin und den Mikrotubuli bestimmen gemeinsam die Schrankenfunktion (38). Shivanna und Srinivas haben gezeigt, dass TNF- $\alpha$  ebenfalls zu einem Abbau der Mikrotubuli gefolgt von einer Zerstörung des Aktomyosinrings und letztendlich einem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion führen kann (139). In diesem Fall konnte jedoch Forskolin, und damit ein erhöhter cAMP-Spiegel den Veränderungen entgegenwirken (139). Auch Birukova et al. und Verin et al. konnten einen Schutzeffekt von Taxol auf einen Nocodazol-induzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion zeigen (13,160). Dieser Rho-abhängige, auf Aktomyosin wirkende Mechanismus, der auch für eine Thrombin-induzierte Mikrotubuli-Reorganisation gezeigt wurde (67), konnte aber für die kälteinduzierte endotheliale Dysfunktion nicht nachvollzogen werden.

Die erzielten Ergebnisse ließen eine zeitliche Abfolge der kälteinduzierten Veränderungen der Endothelzellen von Mikrotubuli-Desintegration  $\rightarrow$  Aktin-Desintegration  $\rightarrow$  Lückenbildung vermuten. Versuche mit Cytochalasin B und Nocodazol scheinen diese Annahme zu bestätigen. Werden die Mikrotubuli pharmakologisch mit Nocodazol zerstört, reagiert das Aktin-Cytoskelett mit Veränderungen und es entstehen erste Lücken im endothelialen Monolayer (Abb. 33). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Birukova et al. und Verin et al. (13,160). Diese beiden Arbeiten begründen den Verlust der endothelialen Schrankenfunktion jedoch mit einer durch die Mikrotubuli-Desintegration bewirkten Rho-Aktivierung und folgender Endothelzellkontraktion. Dieser Signalweg scheint wie oben beschrieben jedoch in der Kälte keine Rolle zu spielen, da eine Rho-Inhibition keine Auswirkungen auf die kälteinduzierten Veränderungen des Cytoskeletts zeigte (Abb. 24).

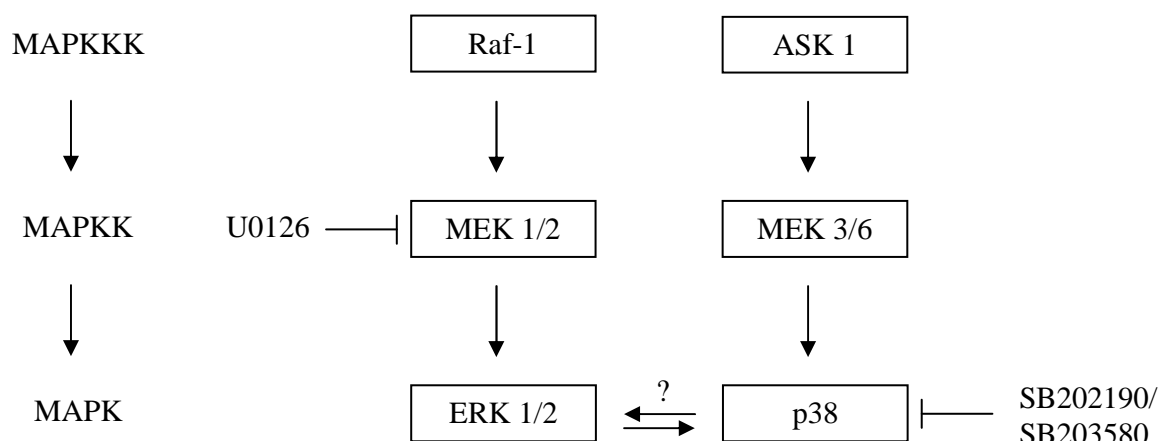
Die Zugabe von Cytochalasin bei 37°C, eine Substanz die die Anlagerung von Aktin-Monomeren verhindert und damit die Aktin-Polymere verkürzt, erzeugt ein ähnliches Bild wie eine längere Kaltinkubation der Zellen (Abb. 33). Das Aktin-Cytoskelett zerfällt, und es entstehen große Lücken zwischen benachbarten Endothelzellen. Das heißt, dass der

Aktinabbau in der Kälte wahrscheinlich einen entscheidenden Schritt beim kälteinduzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion darstellt

### *Einfluss von MAP-Kinasen auf die kälteinduzierte Hyperpermeabilität*

Die endotheliale Schrankenfunktion und das Cytoskelett scheinen in der Kälte parallel aber auch noch von einem weiteren Signalweg reguliert zu werden (Abb. 47). Es konnte hier gezeigt werden, dass Kälte zu einer gesteigerten Phosphorylierung, also einer Aktivierung von p38 führt (Abb. 34) und weiterhin, dass p38-Inhibitoren die Zerstörung des peripheren Aktinrings (Abb. 35) und die Lückenbildung im endothelialen Monolayer (Abb. 36) während der Kaltinkubation verhindern können.

Interessanterweise hatten MEK-Inhibitoren den gleichen Effekt auf die Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts und die Lückenbildung. Die ERK-Aktivität nahm in der Kälte jedoch zunächst ab, und stieg erst in der Wiedererwärmung erneut auf das Niveau der Wärmekontrolle an. Da die wichtigen morphologischen Veränderungen aber bereits in der Kälte auftreten ist davon auszugehen, dass der p38-abhängige Mechanismus den wichtigeren Prozess in der Kälte darstellt. In der Literatur wird von einem „cross talk“ zwischen p38 und ERK berichtet (141) (Abb. 48). Es konnte hier jedoch kein Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 auf die p38-Phosphorylierung in der Kälte beobachtet werden (Abb. 41).



**Abb. 48: Signalkaskade der MAP-Kinasen**

Trotz der gleichen Ergebnisse auf die kälteinduzierten Veränderungen der Morphologie und des Aktin-Cytoskeletts durch p38-Inhibitoren wie durch eine Stabilisierung der Mikrotubuli mit Taxol muss es sich um zwei unterschiedliche regulative Mechanismen handeln. Weder verhindert die Zugabe von Taxol eine p38-Aktivierung in der Kälte, noch waren die p38-Inhibitoren in der Lage, die Mikrotubuli oder die Aktinfaserstruktur in der Kälte zu stabilisieren. Diese beiden Ergebnisse in der Kälte stehen im Gegensatz zu einigen über andere Auslöser getriggerte Cytoskelett-Veränderungen. Birukova et al. konnten zeigen, dass der p38-Inhibitor SB203580 einer Nocodazol-induzierten Mikrotubuli-Desintegration entgegenwirken kann (14). Des Weiteren konnte Bogatcheva et al. zeigen, dass Taxol eine 2-Methoxyestradiol-induzierte p38-Phosphorylierung inhibiert (17). Ebenso konnte gezeigt werden, dass SB203580 einer TNF- $\alpha$ -induzierten Desintegration der Mikrotubuli und nachfolgendem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion entgegenwirkt (109). Aber die genauen Mechanismen, durch welche p38-MAP-Kinase zu einer Störung der endothelialen Schrankenfunktion führt sind auch dort nicht bekannt.

Die Frage nach einer Verbindung bzw. einem gemeinsamen Kettenglied in dem p38-abhängigen und dem Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus des kälteinduzierten Verlustes der Schrankenfunktion bleibt zunächst offen. Es ist beschrieben, dass HSP27 mit den Mikrotubuli assoziiert ist und ein Zielmolekül der p38 MAP-Kinase ist (52). Möglicherweise gibt es eine Beteiligung von HSP27 an den kälteinduzierten Veränderungen und kann die beiden Mechanismen verbinden. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, die aber über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

#### *Tight Junctions, Adherens Junctions und Focal Adhesions*

Eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Schrankenfunktion wird außerdem den junctionalen Proteinen zugeschrieben, die für die Zell-Zell-Kontakte zuständig sind und eng mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert sind, wie zum Beispiel ZO-1 und VE-Cadherin (6,7,32,38,47,159). Trocha et al. zeigten, dass die durch eine Kaltlagerung hervorgerufene Permeabilitätserhöhung mit einer Umverteilung von Occludin und VE-Cadherin korreliert und gingen davon aus, dass dies neben einem Aktinabbau die Ursache einer erhöhten endothelialen Durchlässigkeit ist (152). Brinkkoetter et al. zeigten ebenfalls eine Umverteilung von ZO-1 und Cadherin in der Kälte (23). Wie es sich in dieser Arbeit



darstellt, scheint die Umverteilung von ZO-1 und VE-Cadherin während der Kaltinkubation aber eher eine Konsequenz als die Ursache der erhöhten Permeabilität zu sein. Wie der Zeitverlauf (Abb. 44) zeigt, ist die ZO-1- und VE-Cadherin-Färbung an den Zellrändern noch ähnlich ausgeprägt wie bei den Wärmekontrollen, wenn bereits deutliche Lücken im Monolayer entstanden sind. Wurde die Lückenbildung durch einen p38-Inhibitor oder Taxol gehemmt, gab es keine Umverteilung von ZO-1 und VE-Cadherin.

Da das Aktin-Cytoskelett direkt mit den Proteinen der Tight Junctions und der Adherens Junctions assoziiert ist, scheint eine Umverteilung der junctionalen Proteine als Folge des Zusammenbruchs des peripheren Aktinrings durchaus denkbar. Paxillin, als Vertreter der Focal Adhesions, scheint im Gegensatz zu einem VEGF-induzierten Verlust der endothelialen Schrankenfunktion (12) in der Kälte keine Rolle zu spielen. Es war keine Umverteilung zu beobachten (Abb. 42).

#### *Klinische Implikationen und Ausblick*

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die im Zellkultur-Modell erzielten Ergebnisse auch in intakten Gefäßen eine Rolle spielen, und damit eventuell auch klinisch relevant werden. Der p38-Inhibitor SB202190 konnte sowohl das periphere Aktinband im Endothel von Gefäßstücken konservieren, als auch die endotheliale Schrankenfunktion stärken, wie durch die verminderte Permeabilität für Albumin-gebundenes Evans Blue gezeigt wurde (Abb. 45).

Ziel weiterer Untersuchungen muss es sein, das Resultat von Organtransplantationen und damit die Prognose für die Patienten zu verbessern. Die derzeit klinisch eingesetzte Konservierungslösung (HTK), basierend auf den alten und überkommenen Erkenntnissen zur Konservierungsschädigung, sowie eine Neuentwicklung die zwei Eisenchelatoren enthält (166), hemmen die hier dargestellten Mechanismen nicht. Die erhöhte Permeabilität der Gefäße bzw. die Endothelzellretraktion stellen damit weiterhin eine erhöhte Gefahr einer Ödem- und Thrombusbildung in den ersten Minuten der Reperfusion dar. Daher muss diesem eisenunabhängigen Phänomen und den zugrunde liegenden Mechanismen in Zukunft mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Aus den in Zellkulturexperimenten gewonnenen Ergebnissen müssen nun ‚*in vivo*‘-Experimente zum Erhalt der endothelialen Schrankenfunktion in der Kälte folgen. Die Substanz Taxol muss in diesem Zusammenhang kritisch gesehen werden und diene eher dem

Zweck mechanistischer Untersuchungen. Taxol wird klinisch in der Chemotherapie eingesetzt und verhindert dort die Zellteilung. Da Krebszellen sich deutlich schneller teilen als „normale“ Zellen, sind diese stärker betroffen, jedoch nicht ausschließlich, und es muss mit starken Nebenwirkungen gerechnet werden. Erste Experimente mit einer der Kaltinkubation folgenden Wiedererwärmung bestätigen diese vermutete Toxizität von Taxol (nicht gezeigt). Verschiedene p38-Inhibitoren sind hingegen schon in klinischen Studien der Phase 3 (39) und werden für unterschiedliche Anwendungsgebiete wie chronische Entzündungen, Asthma und Arthritis diskutiert. Sollte der Erhalt der endothelialen Schrankenfunktion in der Kälte durch p38-Inhibitoren ‚*in vivo*‘, das heißt im Tierversuch, bestätigt werden und oben genannte klinische Studien eine Toxizität dieser ausschließen, könnte der Einsatz von p38-Inhibitoren in klinischen Organkonservierungslösungen ein guter Ansatz sein, die endotheliale Schrankenfunktion bei der Gefäß- und Organkonservierung zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Beteiligung der Lysosomen an der kälteinduzierten Zellschädigung durchgeführt. Da der Hauptmechanismus der kälteinduzierten Zellschädigung eisenabhängig verläuft, wurde zunächst geprüft, ob es in der Kälte zu einem Anstieg des intralysosomalen chelatisierbaren Eisenpools kommt. Hierzu wurden primäre Rattenhepatozyten in Zellkulturmedium einer Kaltinkubation ausgesetzt und mit Hilfe der eisenabhängigen lysosomalen Fluoreszenzsonde BDA und quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie die intralysosomale Konzentration chelatisierbaren Eisens gemessen. Unter diesen Bedingungen konnte erstmals ein kälteinduzierter Anstieg des lysosomalen chelatisierbaren Eisens (von einer nicht nachweisbaren Konzentration auf  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) gezeigt werden, welcher aber zu gering ausfiel, um wesentlich am zuvor gezeigten Anstieg des cytosolischen chelatisierbaren Eisens in der Kälte beteiligt zu sein.

Weitere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass Kälte zu einem Verlust der Lysosomenintegrität führt, und weiterhin, dass diese kälteinduzierte Schädigung der Lysosomen über zwei weitgehend voneinander unabhängige Mechanismen verläuft. Eine Kaltinkubation primärer Rattenhepatozyten in physiologischen Medien führte zu einer partiell eisenabhängigen Permeabilisierung der Lysosomen, welche durch die Zugabe des Eisenchelators Desferal verringert werden konnte. Als eine zweite Schädigungskomponente konnte eine Cathepsin B-abhängige Permeabilisierung der Lysosomen identifiziert werden. Diese Komponente konnte durch eine Inkubation in chloridfreiem Medium deutlich verringert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Mechanismen eines kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Schrankenfunktion untersucht. Zu diesem Zweck wurden primäre Schweineaortenendothelzellen für bis zu 72 h in Krebs-Henseleit-Puffer mit oder ohne den Eisenchelator Desferal kaltinkubiert ( $4^{\circ}\text{C}$ ) und anschließend die Veränderungen der Zellmorphologie und verschiedener Elemente des Cytoskeletts und der Zell-Zell-Verbindungen (G- / F-Aktin, Mikrotubuli, ZO-1, VE-Cadherin) durch Phasenkontrast- und Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es bei einer Kaltinkubation primärer Schweineaortenendothelzellen neben einer eisenabhängigen Zellschädigung zu massiven, von einer Zellschädigung unabhängigen morphologischen Veränderungen der Endothelzellen und einem Verlust der endothelialen Schrankenfunktion kommt. Für diese eisenunabhängigen Veränderungen konnte ein komplexer p38-MAP

(Mitogen Activated Protein)-Kinase-, Mikrotubuli und (untergeordnet) HSP90 (Heat Shock Protein 90)-abhängiger Mechanismus demonstriert werden: Während der Kaltinkubation der Endothelzellen war ein massiver Abbau von F-Aktin zu G-Aktin mit einem Verlust der Aktinfasern und des peripheren Aktinrings zu beobachten. Daneben kam es zu einer vollständigen Desintegration der Mikrotubuli in der Kälte. Ein partieller Schutzeffekt konnte durch den Zusatz von HSP90-Inhibitoren während der Kaltinkubation erzielt werden, welche einen Teil der Aktinfasern in der Kälte bewahrten. Auf den Verlust des peripheren Aktinrings und der endothelialen Schrankenfunktion in der Kälte hatten HSP90-Inhibitoren jedoch keinen Einfluss. Der Mikrotubuli-Stabilisator Taxol verhinderte hingegen nicht nur die Desintegration der Mikrotubuli in der Kälte, sondern überraschenderweise auch den kälteinduzierten Abbau der Aktinfasern und des Aktinrings. Die Lückenbildung im endothelialen Monolayer konnte ebenfalls durch Taxol gehemmt werden. Weiterhin konnte mittels Western Blot eine Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase in der Kälte gezeigt werden. Eine Inhibition dieser hemmte sowohl den kälteinduzierten Abbau des peripheren Aktinrings als auch die Lückenbildung, ohne jedoch die Desintegration der Aktinfasern und der Mikrotubuli zu beeinflussen. Wie über Immunfluoreszenz demonstriert werden konnte, waren sowohl Taxol als auch p38-Inhibitoren zudem in der Lage, eine kälteinduzierte Umverteilung der junctionalen Proteine ZO-1 und VE-Cadherin zu verhindern.

Der Hauptbefund dieser Untersuchungen im Zellkulturmodell konnte sodann an intakten Gefäßen bestätigt werden. Wie durch Permeabilitätsbestimmungen mit Albumin-gebundenem Evans Blue gezeigt werden konnte, war der p38-Inhibitor SB202190 in der Lage, die endotheliale Schrankenfunktion in kaltgelagerten Aortensegmenten zu stärken. Diese Ergebnisse zeigen somit viel versprechende neue Ansatzpunkte für einen Erhalt der endothelialen Schrankenfunktion bei der Gefäß- und Organkonservierung auf.



## 6. Material und Methoden

### 6.1. Material

#### 6.1.1. Chemikalien

**Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien.**

Substanz	Hersteller
Leibovitz 15-Medium, Fötales Kälberserum, Glukose, Natrium-orthovanadat, Cantharidin, ML-7, Evans Blue, Paraformaldehyd, Glycerol, Glutamin, Lactobionsäure, TRITC-Phalloidin, FITC-Dextran, Mouse Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper, FITC-Rabbit-Anti-Mouse IgG, Anti-Rabbit IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Forskolin, U0124, U0126, PP2, SU6656, z-FA-fmk, z-IETD-fmk	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
M 199-Medium	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin, Trypsin (2,5 %), Quin-2-Acetoxy-methylester (Quin-2-AM), Alexa Fluor 488 DNase I, FITC-Mouse Monoclonal Anti-ZO-1-Antikörper	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO), Triton X-100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FITC-Goat Polyclonal Anti-VE-Cadherin-Antikörper	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)

Y27632, Okadasäure, Radicicol, 17-AAG, SB202190, SB203580, Taxol, Trichostatin A	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Anti-p44/42 MAP-Kinase-Antikörper, Anti-p38 MAP-Kinase-Antikörper, Anti-phospho p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörper, Anti-phospho p38 MAP-Kinase (Thr180/Tyr182)-Antikörper	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Kollagen R, Kollagenase, Dexamethason	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Desferal	Novartis Pharma (Nürnberg, Deutschland)
Gö6983, GF109203x	Tocris (Bristol, UK)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
ECL Detection Kit	GE Healthcare (München, Deutschland)

### 6.1.2. Zellkulturgefäße und sonstige Materialien

**Tabelle 2: Eingesetzte Materialien.**

Produkt	Hersteller
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ), Zellkulturschalen (35 mm), 6-well-Platten, 15 ml-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläschen	Thermo (Waltham, MA, USA)

---

50 ml-Röhrchen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
12-well-Platten, Inserts für Permeabilitätsmessungen (Falcon, Porengröße: 1 µm, 3 µm, 8 µm)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Gase und Gasgemische	Air Liquide Deutschland GmbH
Mikroskopiekammern, Begasungstöpfe, Färbekammern	Technisches Zentrallabor des UK Essen

---

### 6.1.3. Versuchstiere

Zur Isolation der Hepatozyten wurden männliche Ratten des Wistar-Stammes vom Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit, konstanter Hell-Dunkel-Rhythmus, Standardfutter und Wasser *ad libitum*) in Übereinstimmung mit dem geltenden Tierschutzgesetz gehalten.

## 6.2. Methoden

### 6.2.1. Zellpräparation und Zellkultivierung

#### 6.2.1.1. Präparation und Kultivierung von Hepatozyten

Die Isolation der Hepatozyten wurde nach der von de Groot und Brecht beschriebenen Methode durchgeführt (31). Dabei erfolgte eine Perfusion der Leber mit kollagenasehaltigem, mit Carbogen begastem Krebs-Henseleit-Puffer mit anschließender mechanischer Separation und Zentrifugation der Hepatozyten. Die Zellen wurden anschließend für die Fluoreszenzmessungen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /well ( $9,6 \text{ cm}^2$ ) auf kollagenbeschichtete Deckgläschen (28 mm) angeimpft. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte in Leibovitz-

15-(L15)-Medium, das mit 5 % fötalem Kälberserum, Glucose (8,3 mM), L-Glutamin (2 mM), Rinderserumalbumin (0,1 %), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Dexamethason (1 µM) und NaHCO<sub>3</sub> (14,3 mM) ergänzt wurde, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> / 95 % Raumluft (Brutschrank Heraeus 6000, Hanau; Deutschland). Die Zellen wurden zwei Stunden nach dem Animpfen nochmals mit HBSS gewaschen und für weitere 20-24 h bis zum Beginn der Experimente in L15-Zellkulturmedium kultiviert.

#### **6.2.1.2. Präparation und Kultivierung von Schweineaortenendothelzellen**

Aortenendothelzellen wurden wöchentlich frisch aus Schweineaorten von 7-8 Monate alten Hausschweinen isoliert. Dazu wurden die Schweineaorten innerhalb von 20 bis 30 Minuten nach dem Tod der Tiere durch Ausbluten nach dem elektrischen Betäuben entnommen, und innerhalb von 30 Minuten vom städtischen Schlachthof in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit Glukose (10 mM) bei Raumtemperatur zum Institut transportiert. Anschließend wurde das Binde- und Fettgewebe entfernt und die Aorten wurden ausgiebig mit PBS (37°C) gewaschen. Danach wurde die Aorta längs eröffnet, mit Kanülen auf einem Korkbrett aufgespannt und die Endothelzellen dann durch sanftes Schaben mit einem 21er Einweg-Skalpell über die Intima-Seite der Gefäße isoliert. Die abgeschabten Endothelzellen wurden in 15 ml serumfreiem M199-Medium in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen, für 10 Minuten bei 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend in 5 ml sterilem M199-Medium, ergänzt mit 20 % fötalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Glutamin (2 mM) resuspendiert und auf kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) angeimpft. Nach 5 Stunden wurden die frisch kultivierten Endothelzellen nochmals mit HBSS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versetzt. Nach 3-4 Tagen erreichten die Zellen Konfluenz und wurden durch Trypsinisierung (1 ml 0,25 % Trypsin) subkultiviert. Zunächst erfolgte zur weiteren Vermehrung der Zellen ein Umsetzen auf 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen und nach weiteren 3 Tagen das Splitten auf Versuchsgefäße. Dazu wurden die Zellen erneut trypsinisiert (3 ml 0,25 % Trypsin) und in einem Verhältnis von 1:3 auf kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen/-platten oder kollagenbeschichtete Deckgläschen gesplittet. Die Experimente wurden 2 Tage nach der Subkultivierung durchgeführt.

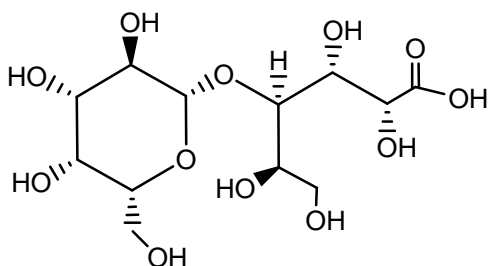


### 6.2.2. Zusammensetzung verwendeter Lösungen

**Tabelle 3a: Zusammensetzung verwendeter Lösungen.**

<b>KH</b>		<b>KH-Lactobionat</b>	
NaCl	115,0 mM	Na-Lactobionat*	117,4 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mM		
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,0 mM	NaHCO <sub>3</sub>	25,0 mM
KCl	5,9 mM	K-Lactobionat*	5,9 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
HEPES	20,0 mM	HEPES	20,0 mM

\* Na-Lactobionat und K-Lactobionat wurden durch die 1:1-Umsetzung von Lactobionsäure (Abb. 49) mit NaOH oder KOH erhalten.



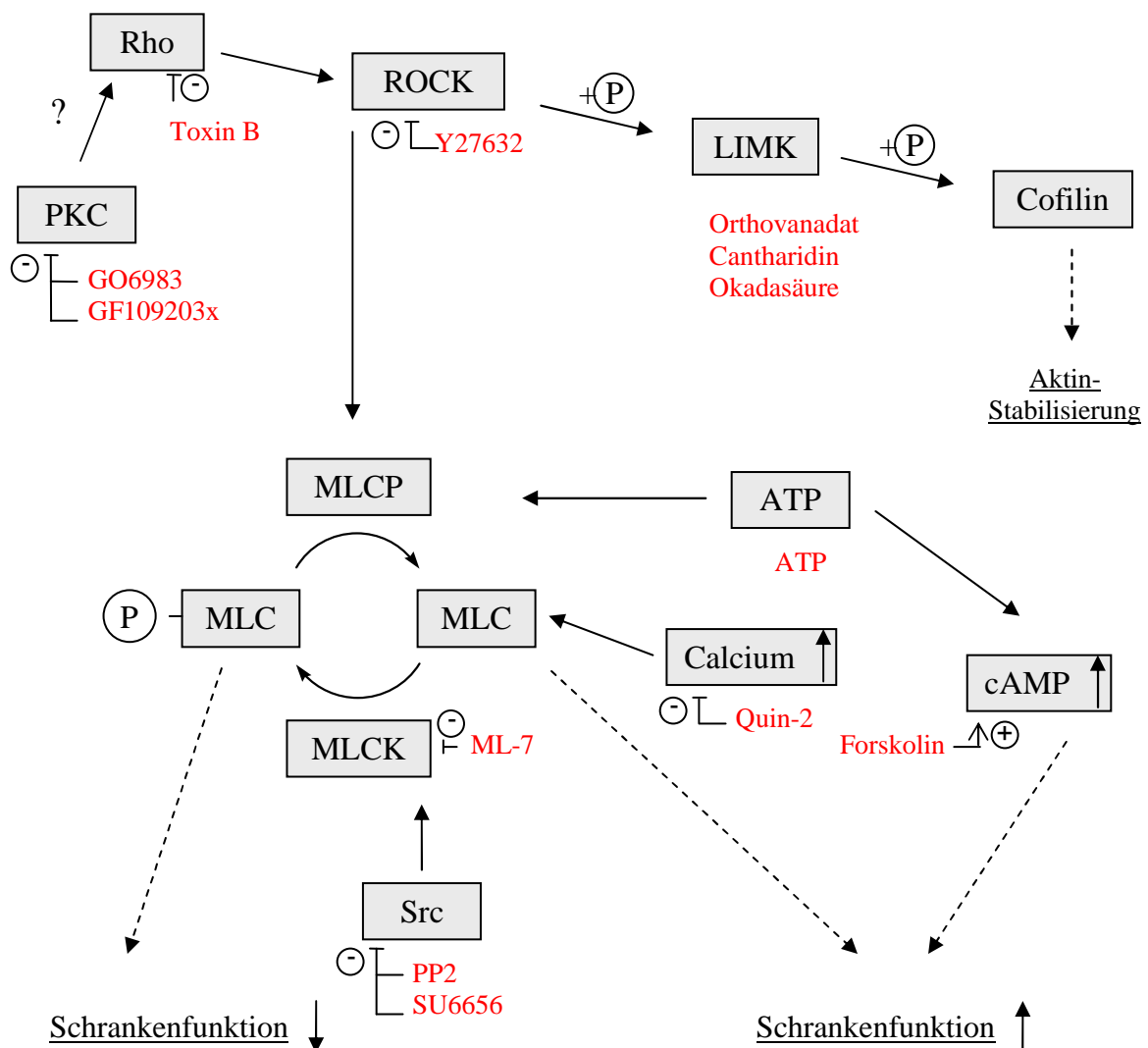
**Abb. 49: Lactobionsäure.**

**Tabelle 3b: Zusammensetzung verwendeter Lösungen.**

<b>PBS</b>		<b>HBSS</b>	
NaCl	137,0 mM	NaCl	137,0 mM
KCl	2,7 mM	KCl	5,3 mM
		MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
		MgSO <sub>4</sub>	0,4 mM
		CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM
		HEPES	25,0 mM

### 6.2.3. Allgemeines experimentelles Vorgehen

Für die Experimente zum Modell der Kaltinkubation mit anschließender Wiedererwärmung wurde eine gleich bleibende Vorgehensweise verwendet. Die kultivierten Zellen wurden zu Versuchsbeginn zunächst dreimal mit HBSS (37°C) gewaschen und anschließend mit der Inkubationslösung bedeckt. Einigen Ansätzen wurden entweder durch Vorinkubation (VI) in KH-Puffer bei 37°C und/oder als Zusatz über die ganze Kaltinkubationsphase (Zusatz) Hemmstoffe zugesetzt (siehe Tabelle 4 und Abb. 50). Lösemittelkontrollen (DMSO, Ethanol) wurden integriert.



**Abb. 50: Hemmstoffe der diskutierten Mechanismen einer Permeabilitätserhöhung.**

Verwendete Abkürzungen: ATP – Adenosintriphosphat, cAMP – Cyclisches Adenosinmonophosphat, LIMK – LIM-Kinase, MLC – Myosin Light Chain, MLCK – Myosin Light Chain Kinase, MLCP – Myosin Light Chain Phosphatase, PKC – Proteinkinase C, ROCK – Rho-Kinase, Src – Tyrosinkinase Src. Hemmstoffe siehe Tabelle 4.

Anschließend wurden die Versuchsgefäße für die gewünschte Zeitspanne bei 4°C inkubiert. Versuchsansätze in Bicarbonat-gepufferten Medien wurden in Begasungstöpfen mit einer Atmosphäre aus 5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 74 % N<sub>2</sub> inkubiert. Am Ende der Kaltinkubationsperiode wurden die Zellen mit kaltem HBSS gewaschen, mit Zellkulturmedium (4°C) versetzt und für 1-3 Stunden bei 37°C im Brutschrank wiedererwärmt.

**Tabelle 4: Hemmstoffe.**

<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Zugabemodus</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Desferal	1 mM	VI 30 min 37°C + Zusatz	H <sub>2</sub> O
Glukose	10 mM	Zusatz	H <sub>2</sub> O
ATP	10 µM	Zusatz	H <sub>2</sub> O
Forskolin	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
Toxin B	10 ng/ml	VI 60 min 37°C	H <sub>2</sub> O
Y-27632	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	H <sub>2</sub> O
ML-7	1 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
U0126	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
U0124	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
SB202190	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
SB203580	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
Radicicol	4 µg/ml	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
17-AAG	4 µg/ml	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
PP2	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
SU6656	10 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
Gö6983	1 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
GF109203x	1 µM	VI 30 min 37°C + Zusatz	DMSO
Orthovanadat	10-100 µM	VI 60 min 37°C + Zusatz	H <sub>2</sub> O
Cantharidin	1-10 nM	VI 60 min 37°C + Zusatz	DMSO
Okadasäure	1-5 nM	VI 60 min 37°C + Zusatz	Ethanol
Taxol	10-100 µM	VI 45 min 37°C + Zusatz	DMSO

Trichostatin A	50-500 nM	VI 45 min 37°C + Zusatz	DMSO
Quin-2	10 µM	VI 30 min 37°C	DMSO
z-FA-fmk	10 µM	VI 60 min 37°C + Zusatz	DMSO
z-IETD-fmk	25 µM	VI 60 min 37°C + Zusatz	DMSO

Zu jedem Experiment wurden Lösungsmittelkontrollen durchgeführt. Die Zugabe machte max. 1 % des Endvolumens aus.

#### 6.2.4. Quantifizierung der Zellschädigung durch Bestimmung der LDH-Freisetzung

Das cytosolische Enzym Lactatdehydrogenase wird von geschädigten Zellen in das extrazelluläre Medium abgegeben und kann so als Parameter für die Zellschädigung dienen. Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurden dem Medium in definierten zeitlichen Abständen Proben entnommen und die LDH-Aktivität mit Hilfe eines Analyseautomaten (Selectra E, Vital Scientific, Dieren, Niederlande) photometrisch erfasst. Hierbei wurde die Enzymaktivität anhand der Umsatzgeschwindigkeit des Coenzym NADH bestimmt. Bei der Berechnung der prozentualen LDH-Freisetzung wurden die durch die Probenentnahme entstehenden Volumenänderungen berücksichtigt.



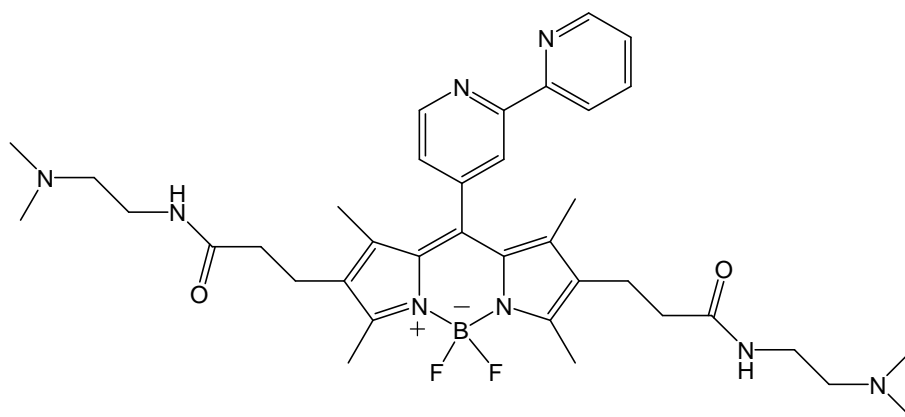
#### 6.2.5. Bestimmung der Zellmorphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie

Auf Glasplättchen oder Zellkulturgefäßen kultivierte Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt des Versuches mikroskopisch untersucht. Die zelluläre Morphologie wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Typ Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in unterschiedlichen Vergrößerungen (Objektiv LD A-Plan 20x, Objektiv Plan Neofluar 40x, Objektiv Plan Neofluar 63x) beurteilt und dokumentiert.



### 6.2.6. Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in den Lysosomen primärer Hepatozyten in der Wärme und nach Kaltinkubation

Zur Bestimmung der intralysosomalen chelatisierbaren Eisenionen wurde der spezifische Fluoreszenzindikator BDA (2,6-Bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen, Abb. 51 (Dissertation, A. Springer); synthetisiert in der Organischen Chemie, AK Sustmann, Universität Duisburg-Essen) verwendet.

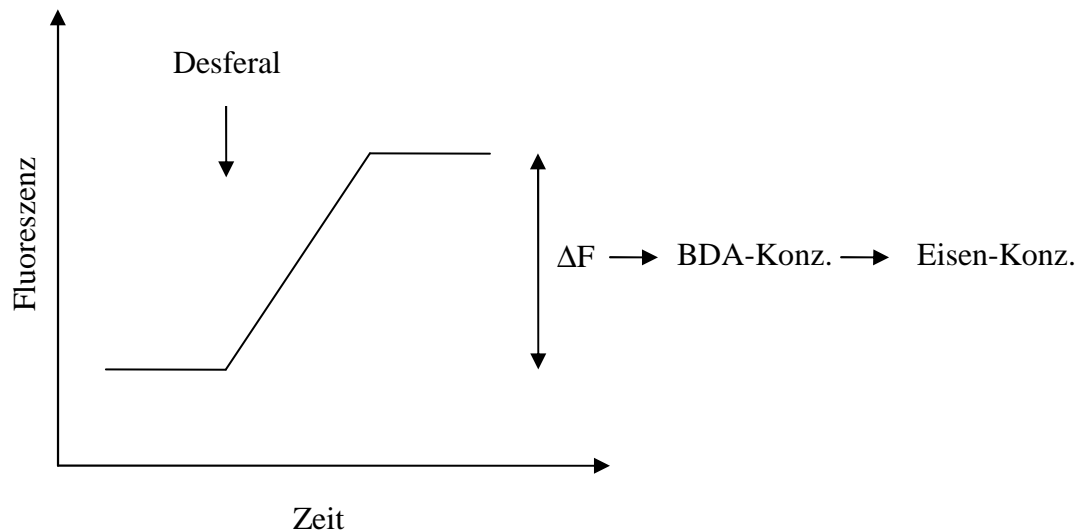


**Abb. 51: Fluoreszenzsonde BDA.**

Die Fluoreszenzsonde besitzt als Chelatoreinheit eine Dipyridyleinheit, welche einen 3:1-Komplex mit Eisen (II) bildet. Eisen (III) wird nur in sehr geringem Umfang komplexiert (Dissertation, A. Springer). Hat sich die Sonde aufgrund des niedrigen pH-Wertes in den Lysosomen/Endosomen angereichert, wird die Fluoreszenz des Indikators bei Vorhandensein chelatisierbarer Eisenionen durch die Komplexbildung dieser Eisenionen gelöscht. Gibt man dann einen stärkeren Eisenchelator in großem Überschuss zu, werden die Eisenionen vom Fluoreszenzfarbstoff entfernt und die Fluoreszenzintensität nimmt zu (Entquenchung, Abb. 52). Über diesen Anstieg der Fluoreszenzintensität kann mit Hilfe quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie der intralysosomale chelatisierbare Eisenpool bestimmt werden.

Die konfokale Bilddarstellung des Laser-Scanning-Mikroskops (Typ Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul, Zeiss, Oberkochen, Deutschland, Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) ermöglicht es, Fluoreszenzintensitäten eines definierten Volumens zu erfassen. Die intralysosomale Fluoreszenz kann so direkt mit Indikatorstandards verglichen werden, und es bedarf keiner intrazellulären Eichung. Das Pinhole wurde dazu auf 118  $\mu\text{m}$

eingestellt, wodurch gleich bleibende optische Schnitte von etwa 1,0  $\mu\text{m}$  Dicke produziert wurden.



**Abb. 52: Funktionsprinzip der Bestimmung des intralysosomalen chelatisierbaren Eisenpools.**

Die Zellen werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff BDA beladen, dessen Fluoreszenz intralysosomal durch die Komplexbildung von Eisenionen gelöscht wird. Gibt man dann einen stärkeren Eisenchelator (Desferal) im Überschuss zu, werden die Eisenionen vom Fluoreszenzfarbstoff entfernt und die Fluoreszenzintensität nimmt zu (Entquenchung). Über diesen Anstieg der Fluoreszenzintensität ( $\Delta F$ ) kann der lysosomale chelatisierbare Eisenpool quantifiziert werden.

Für die zellulären Messungen wurden auf kollagenbeschichteten Deckgläschen kultivierte primäre Rattenhepatozyten mit BDA (1  $\mu\text{M}$  in HBSS, 45 min, 37 °C) beladen und 15 min in HBSS bei 37°C nachinkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in Pentz-Kammern eingespannt und Fluoreszenzmessungen am Laser-Scanning-Mikroskop ( $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530\text{-}600 \text{ nm}$ ) durchgeführt. Während der gesamten Messzeit wurden die Messkammern auf 37°C temperiert und zur Konstanthaltung des Zellüberstandvolumens mit einem Deckgläschen verschlossen gehalten. Nachdem eine konstante Ausgangsfluoreszenz erreicht war, wurde dem Zellüberstand der Eisenchelator Desferal (10 mM) zugesetzt und über 2 Stunden in Zeitintervallen von 30 Minuten die Fluoreszenzintensität dokumentiert. Um die intralysosomale chelatisierbare Eisenkonzentration in der Kälte zu bestimmen, wurden die Hepatozyten zunächst bei 37°C beladen (1  $\mu\text{M}$  in HBSS, 45 min, 37 °C) und anschließend für 3 Stunden in L15-Zellkulturmedium kaltinkubiert (4°C). Danach wurden wiederum (wie oben beschrieben) Fluoreszenzmessungen am Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt und die Fluoreszenz durch Zugabe von Desferal (10 mM) für 2 Stunden bei 37°C „entquench“.

Die intralysosomale Konzentration des eisenfreien und damit fluoreszierenden Indikators BDA wurde durch den Vergleich der gemittelten intralysosomalen Fluoreszenzintensität mit den Fluoreszenzintensitäten verschiedener Indikatorstandards (20-80  $\mu\text{M}$ ) in einem mit Chelex100 (20 g/L, 24 h, 4°C) behandelten Acetat-Puffer (0,72 M, pH 4,5), bei identischen Mikroskopeinstellungen wie bei den zellulären Messungen, bestimmt. Dazu wurden Aliquots der Indikatorstandards auf ein Deckgläschen pipettiert und die Fluoreszenzintensität in einer Fokusebene 10  $\mu\text{m}$  oberhalb der Glasoberfläche gemessen. Die Temperatur wurde über die gesamte Zeit mit Hilfe eines temperierbaren Mikroskoptisches konstant bei 37°C gehalten.

Die durchschnittliche Intensitätszunahme der lysosomalen Fluoreszenz wurde aus dem Vergleich des Bildes vor Desferalzugabe mit dem Bild nach zweistündiger Entquenchung ermittelt. Die durchschnittliche Intensitätszunahme berechnete sich über die gemittelte

intralysosomale Fluoreszenz des Bildes aus: 
$$\frac{\sum \text{Frequenz} \times \text{Intensitätsdifferenz}}{\sum \text{Frequenz}}$$

Aus dem Vergleich der Kalibriergeraden, der intralysosomalen Fluoreszenzzunahme ( $\Delta F$ ) nach der Entquenchung mit Desferal, und aus der Kenntnis eines 3:1-Komplexes mit Eisen (II) konnte damit auch die intralysosomale Eisen (II)-Konzentration bestimmt werden.

#### **6.2.7. Bestimmung der lysosomalen Integrität nach Kaltlagerung**

Zur Bestimmung der lysosomalen Integrität wurden auf Deckgläschen kultivierte primäre Rattenhepatozyten mit dem lysosomalen Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker Red (1  $\mu\text{M}$ ) beladen und die Fluoreszenz mit dem Laser-Scanning-Mikroskop erfasst. Die Beladung erfolgte entweder für 20 min bei 37°C für die Wärmekontrolle oder für 40 min bei 4°C für kaltinkubierte Zellen. Die Kaltinkubation erfolgte über einen Zeitraum von 6-24 Stunden in L15-Zellkulturmedium bzw. Krebs-Henseleit (KH)-Puffer. Zur Bestimmung der Chloridabhängigkeit der lysosomalen Schädigung wurde ein modifizierter KH-Puffer verwendet, in dem Chlorid (nahezu) vollständig durch das impermeable Anion Lactobionat substituiert wurde (Tabelle 3a). Um die eisenunabhängige Komponente der Zellschädigung weiter zu charakterisieren, wurden der Caspase-8-Inhibitor z-IETD-fmk und der Cathepsin-B-Inhibitor z-FA-fmk eingesetzt (Tabelle 4). Nach Ende der Kaltinkubation erfolgte die Fluoreszenzmessung in Pentz-Kammern mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops ( $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} \geq 585 \text{ nm}$ ).

### **6.2.8. Fixieren von Zellen und Geweben**

#### *Fixieren adhärenter Zellen:*

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zum gewünschten Versuchszeitpunkt vorsichtig mit HBSS gewaschen, dann mit einer 4 %igen Paraformaldehydlösung bedeckt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von Paraformaldehydrückständen wurden die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für die Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Proteine wurde im Anschluss zusätzlich die Zellmembran für 10 min mit einer 0,1 %igen Triton-X-100-Lösung bei Raumtemperatur permeabilisiert und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun sofort weiter verarbeitet oder in PBS mit 0,1 % Natriumazid bei 4°C gelagert werden.

#### *Fixieren von Gewebestücken:*

Aufgrund einer erhöhten Schichtdicke verlängert sich die Fixierzeit bei Gewebestücken. Für eine Aktinfärbung an Schweineaortenstücken erwies sich eine Fixierzeit von zwei Stunden (37°C) als geeignet.

### **6.2.9. Fluoreszenzmarkierung von Cytoskelett-Bestandteilen und junctionalen Proteinen**

#### **6.2.9.1. Aktin**

F-Aktin kann spezifisch durch Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat (TRITC)-markiertes Phalloidin – ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes – angefärbt werden, da Phalloidin an F-Aktin, jedoch nicht an globuläres Aktin bindet. Für den simultanen Nachweis von G-Aktin kann AlexaFluor 488 DNase I genutzt werden.

Zur Färbung wurden die auf kollagenbeschichteten Deckgläschen kultivierten Schweineaortenendothelzellen zum gewünschten Zeitpunkt mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1 % Triton permeabilisiert. Die Präparate wurden dann auf einer mit Parafilm präparierten Zellkulturschale platziert, mit 200 µl PBS mit TRITC-Phalloidin (0,5 µg/ml) und



AlexaFluor 488 DNase I (2 µg/ml) bedeckt und lichtgeschützt für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um eine niedrigere Hintergrundfärbung zu erzielen, wurden die Schalen zusätzlich über Nacht mit 2 ml PBS im Wärmeschrank gelagert und nochmals gewaschen. Nach dem Einbetten in Glycerol/PBS (1:1) erfolgte die Detektion mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops (Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} \geq 585 \text{ nm}$  für die rote Fluoreszenz von TRITC-Phalloidin und bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$  für die grüne Fluoreszenz von AlexaFluor DNase I. Durch einen Strahlenteiler bei 545 nm im Emissionsweg des Mikroskops konnten beide Wellenlängen gleichzeitig erfasst werden.

#### **6.2.9.2. $\alpha$ -Tubulin**

Zur Darstellung der Mikrotubuli wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz angewandt. Dazu wurde ein primärer Antikörper (Mouse monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper) verwendet, der spezifisch an die  $\alpha$ -Kette von Tubulin bindet und ein sekundärer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierter Antikörper (FITC-Rabbit-Anti-Mouse IgG), der sich gegen den ersten Antikörper richtet.

Die auf kollagenbeschichteten Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zum gewünschten Versuchszeitpunkt mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1 % Triton permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit dem Primärantikörper (10 µg/ml in PBS) inkubiert, dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und danach lichtgeschützt für 30 min bei 37°C mit dem sekundären Antikörper (1:100 in PBS) inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach dem Einbetten in Glycerol/PBS (1:1) mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ .

#### **6.2.9.3. VE-Cadherin, ZO-1 und Paxillin**

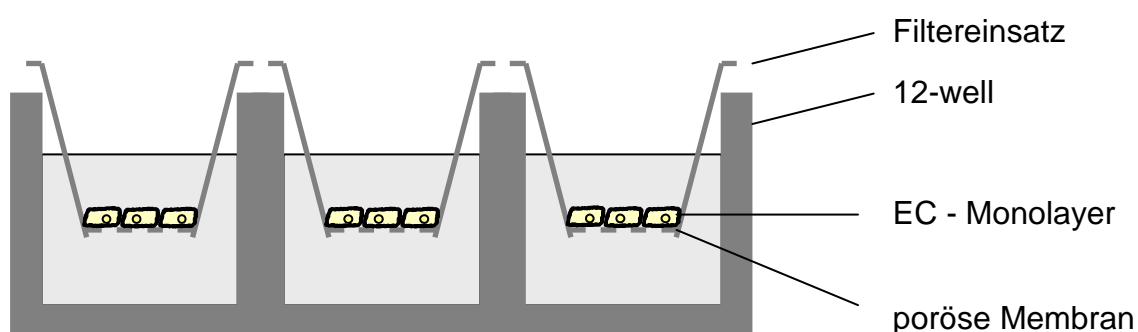
VE-Cadherin, als Protein der Adherens Junctions, ZO-1, als Protein der Tight Junctions, und Paxillin, Protein der Focal Adhesions wurden über direkte Immunfluoreszenz angefärbt.

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zum gewünschten Versuchszeitpunkt mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1 % Triton permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen lichtgeschützt für eine Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden Antikörper (Monoclonal Alexa Fluor Anti-ZO-1-Antikörper, Invitrogen, 5 µg/ml in PBS, oder Polyclonal FITC Anti-VE-Cadherin-Antikörper, Santa Cruz, 10 µg/ml in PBS) inkubiert, und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte nach dem Einbetten in Glycerol/PBS (1:1) mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops (Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$ .

#### 6.2.10. Permeabilitätsbestimmung an endothelialen Monolayern

Die Permeabilität der endothelialen Monolayer wurde anhand der Durchlässigkeit für FITC-konjugiertes Dextran bestimmt. Dazu wurden Schweineaortenendothelzellen auf speziellen kollagenbeschichteten Filtereinsätzen mit einer Porengröße von 1-8 µm kultiviert, die in 12-well-Zellkulturplatten eingehängt wurden (17, Abb. 53).

Zur Permeabilitätsbestimmung wurde zum gewünschten Versuchszeitpunkt eine FITC-Dextran-Lösung (200 µg/ml in HBSS) in den Filtereinsatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde dann mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenreaders (Fluostar, BMG Labtech,  $\lambda_{\text{exc.}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 515\text{-}525 \text{ nm}$ ) die Fluoreszenz-Intensität in dem unteren Kompartiment (12-well) gemessen.



**Abb. 53: Schematische Darstellung der Permeabilitätsbestimmung an endothelialen Monolayern.**

Schweineaortenendothelzellen wurden auf speziellen kollagenbeschichteten Filtereinsätzen mit einer Porengröße von 1-8 µm kultiviert, die in 12-well-Zellkulturplatten eingehängt wurden. Die Permeabilität konnte dann über den Durchsatz einer fluoreszierenden Substanz aus dem Filtereinsatz in das darunter gelegene 12-well bestimmt werden.

### **6.2.11. Permeabilitätsbestimmung an Segmenten der Schweineaorta**

Die Wärmekontrollen wurden schnellstmöglich nach Entnahme der Aorten aus den Schweinen durchgeführt (nach ca. 90 min Lagerung in PBS + Glukose). Zur Bestimmung der kälteinduzierten Permeabilitätsveränderungen wurden Schweineaorten-Segmente zunächst für 7 Tage in KH-Puffer + Desferal (1 mM) bei 4°C kaltgelagert. Einige der Segmente wurden zusätzlich mit dem p38-Inhibitor SB202190 (10 µM) inkubiert. Zur Bestimmung der endothelialen Permeabilität in diesen Segmenten wurden diese zum gewünschten Zeitpunkt in einer 35 mm-Zellkulturschale für 5 min Albumin-gebundenem Evans Blue in PBS (0,3 % Evans Blue (w/v), 1 % BSA in PBS, (158)) ausgesetzt. War die endotheliale Barrierefunktion nicht mehr oder nur noch eingeschränkt gegeben, färbte sich das subendotheliale Gewebe blau. Nach dem Waschen zum Entfernen ungebundener Färbelösung wurden die Aorten-Segmente mit Hilfe eines Zeiss Stemi 2000-C Stereo-Mikroskops, ausgestattet mit einer digitalen Canon D 30 Kamera, photographiert und die Einfärbung des subendothelialen Gewebes bewertet.

### **6.2.12. Zellyse und Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Er beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 in saurer Lösung einen Komplex mit Proteinen bildet, der das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Die Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

In 12,5 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultivierte Zellen wurden zum gewünschten Versuchszeitpunkt mit 300 µl Lysepuffer (1 % SDS) lysiert, mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinbestimmung wurden 10 µl des Zelllysats mit 990 µl Bradford-Reagenz vermischt und nach 10 min Inkubationszeit die Absorption bei 595 nm an einem Photometer (Shimadzu UV-mini 1240) bestimmt. Zur Kalibrierung wurde eine Standardreihe mit einer BSA-Konzentration von 1-20 µg/ml angelegt.

### 6.2.13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zum Auftrennen von Proteinen verwendet. Durch die Bindung an SDS erhalten die Proteine eine durchgehend negative Ladung und können so in einem elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht nach separiert werden. Als Matrix dient ein Polyacrylamid-Gel (Tabelle 5).

Für die Elektrophorese wurden die zu analysierenden Zelllysate im Verhältnis 2:1 mit Lämmli-Puffer vermischt, für 5 min auf 90°C erhitzt und anschließend eine konstante Proteinmenge (5 µg für (Phospho-) p38-MAPK und 10 µg für (Phospho-) p44/42-MAPK) auf das Gel aufgetragen. Dann wurde für ca. 2 h eine Spannung von 100 V an die Elektrophorese-Einheit (Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell) angelegt, bis ein mitlaufender Marker (Fermentas Prestained Protein Ladder SM0671) das untere Ende des Gels erreicht hatte.

**Tabelle 5: Benötigte Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

---

Trenngel	10 % Acrylamid
	375 mM Tris pH 8,8
	0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
	0,1 % Ammoniumpersulfat (APS)
	0,04 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgel	5 % Acrylamid
	187,5 mM Tris pH 6,8
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED
Lämmli-puffer	30 % Glycerol
	15 % $\beta$ -Mercaptoethanol
	187,5 mM Tris pH 6,8
	6 % SDS
	0,003 % Bromphenolblau

---

Laufpuffer	125 mM Tris 1,25 M Glycin 0,1 % SDS pH 8
Blotpuffer	20 % Ethanol in Laufpuffer
TBST (Tris-buffered saline + Tween 20)	137 mM NaCl 20 mM Tris 0,1 % Tween 20 pH 7,6

---

#### **6.2.14. Western Blot**

Beim Westernblot werden die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld vom Gel auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose übertragen, auf der die gewünschten Proteine später nachgewiesen werden können.

Für den Transfer vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde die Blot-Einheit (Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell) mit auf 4°C gekühltem Blotpuffer gefüllt und für eine Stunde eine Spannung von 70 Volt angelegt. Anschließend wurden die Nitrocellulose-Membranen entnommen und zu Vermeidung einer Austrocknung bis zur Weiterverarbeitung einige Minuten in TBST (Tris-buffered saline + Tween 20, Tabelle 5) gelagert.

#### *Immundetektion*

Nach der Elektrophorese und dem Western Blot müssen die zu bestimmenden Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Dabei macht man sich die Antigen-Antikörper-Bindung zu nutze. Für eine spezifische Bindung des jeweiligen Antikörpers müssen zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Dazu wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (TBST mit 5 % fötalem Kälberserum) auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper



behandelt. Die Membran wurde mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörpers (Anti-p44/42 MAP-Kinase-Antikörper, Anti-p38 MAP-Kinase-Antikörper, Anti-phospho p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörper, Anti-phospho p38 MAP-Kinase (Thr180/Tyr182)-Antikörper) in 1 ml Blockierlösung in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgten vier 20-minütige Waschschrte mit TBST, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde für 30 min bei Raumtemperatur die Lösung mit dem sekundären Antikörper (der gegen den Primär-Antikörper gerichtet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war (Sigma, Anti-Rabbit IgG Peroxidase); 1:5000) auf die Membran gegeben. Zum Schluss erfolgten wiederum vier 20-minütige Waschschrte mit TBST.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein ECL-Kit (Chemilumineszenz-Kit, GE-Healthcare) verwendet. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert dabei die Umsetzung eines Luminol-Derivates in seine oxidierte Form, von welcher dann eine Lumineszenz detektiert werden konnte. Dazu wurden die Western Blots in der Dunkelheit je nach Signalstärke einige Sekunden auf einem Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurden die Filme für einige Sekunden in eine Entwicklerlösung (Tetenal Roentogen Liquid), und nach einem Waschschrte für einige Sekunden in Fixiermittel (Kodak Polymax RT) getaucht.

## 7. Literatur

1. Adamson RH, Curry FE, Adamson G, Liu B, Jiang Y, Aktories K, u. a. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J. Physiol. (Lond.)*. 2002; 539 (Pt 1): 295-308.
2. Ali N, Yoshizumi M, Yano S, Sone S, Ohnishi H, Ishizawa K, u. a. The novel Src kinase inhibitor M475271 inhibits VEGF-induced vascular endothelial-cadherin and beta-catenin phosphorylation but increases their association. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 102 (1): 112-120.
3. Antonov A, Snead C, Gorshkov B, Antonova GN, Verin AD, Catravas JD. Heat shock protein 90 inhibitors protect and restore pulmonary endothelial barrier function. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 39 (5): 551-559.
4. Arthur PG, Niu X, Rigby P, Steer JH, Jeffrey GP. Oxidative stress causes a decline in lysosomal integrity during hypothermic incubation of rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44 (1): 24-33.
5. Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, u. a. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 288 (2): G396-402.
6. Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb. Haemost.* 2006; 95 (1): 36-42.
7. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* 2004; 84 (3): 869-901.
8. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45 (4): 673-676.
9. Bindewald K, Gündüz D, Härtel F, Peters SC, Rodewald C, Nau S, u. a. Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2004; 287 (5): C1246-1255.
10. Birukov KG. Small GTPases in mechanosensitive regulation of endothelial barrier. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (1): 46-52.
11. Birukova AA, Birukov KG, Smurova K, Adyshev D, Kaibuchi K, Alieva I, u. a. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *FASEB J.* 2004; 18 (15): 1879-1890.
12. Birukova AA, Cokic I, Moldobaeva N, Birukov KG. Paxillin is involved in the differential regulation of endothelial barrier by HGF and VEGF. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009; 40 (1): 99-107.

13. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Usatyuk P, Liu F, Kaibuchi K, u. a. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 2004; 201 (1): 55-70.
14. Birukova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JGN, Verin AD. MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; 289 (1): L75 -L84.
15. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JGN, Verin AD. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvascular Research* 2004; 67 (1): 64-77.
16. Bogatcheva NV, Garcia JGN, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry Mosc.* 2002; 67 (1): 75-84.
17. Bogatcheva NV, Adyshev D, Mambetsariev B, Moldobaeva N, Verin AD. Involvement of microtubules, p38, and Rho kinases pathway in 2-methoxyestradiol-induced lung vascular barrier dysfunction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007; 292 (2): L487-499.
18. Bogatcheva NV, Dudek SM, Garcia JGN, Verin AD. Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *J. Investig. Med.* 2003; 51 (6): 341-352.
19. Bogatcheva NV, Verin AD. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc. Res.* 2008; 76 (3): 202-207.
20. Borbiev T, Birukova A, Liu F, Nurmukhambetova S, Gerthoffer WT, Garcia JGN, u. a. p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287 (5): L911-918.
21. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (1): 26-34.
22. Breton S, Brown D. Cold-induced microtubule disruption and relocalization of membrane proteins in kidney epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998; 9 (2): 155-166.
23. Brinkkoetter P-T, Beck GC, Gottmann U, Loesel R, Schnetzke U, Rudic B, u. a. Hypothermia-induced loss of endothelial barrier function is restored after dopamine pretreatment: role of p42/p44 activation. *Transplantation* 2006; 82 (4): 534-542.
24. Bruce Alberts DB. *Molecular Biology of the Cell.* 1994; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20684>.
25. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989; 10 (3): 292-299.
26. Carbajal JM, Schaeffer RC Jr. RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* 1999; 277 (5 Pt 1): C955-964.

27. Casiraghi M, Tatreau JR, Abano JB, Blackwell JW, Watson L, Burridge K, u. a. In vitro modeling of nonhypoxic cold ischemia-reperfusion simulating lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 138 (3): 760-767.
28. Chatterjee A, Snead C, Yetik-Anacak G, Antonova G, Zeng J, Catravas JD. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate LPS-induced endothelial hyperpermeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 294 (4): L755-763.
29. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53 (5): 957-978.
30. Csontos C, Kolosova I, Verin AD. Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007; 293 (4): L843-854.
31. de Groot H, Brecht M. Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by  $O_2/H_2O_2$  liberated by sources other than xanthine oxidase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1991; 372 (1): 35-41.
32. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell. Sci.* 2008; 121 (Pt 13): 2115-2122.
33. Devillard L, Vandroux D, Tissier C, Dumont L, Borgeot J, Rochette L, u. a. Involvement of microtubules in the tolerance of cardiomyocytes to cold ischemia-reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 2008; 307 (1-2): 149-157.
34. Diestel A, Roessler J, Pohl-Schickinger A, Koster A, Drescher C, Berger F, u. a. Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: A possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. *Vasc. Pharmacol.* 2009; 51 (4): 246-252.
35. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011; 40: 169-186.
36. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, u. a. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 2003; 83 (2): 433-473.
37. Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, u. a. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5 (11): 2767-2776.
38. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91 (4): 1487-1500.
39. Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, u. a. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23 (3): 329-336.

- 
40. Farooki AZ, Epstein DL, O'Brien ET. Tyrphostins disrupt stress fibers and cellular attachments in endothelial monolayers. *Exp. Cell Res.* 1998; 243 (1): 185-198.
  41. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, u. a. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J. Clin. Invest.* 1999; 103 (1): 137-145.
  42. Frank A, Rauen U, de Groot H. Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J. Hepatol.* 2000; 32 (1): 58-66.
  43. Fuchs E, Yang Y. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 1999; 98 (5): 547-550.
  44. Fuckert O, Rauen U, de Groot H. A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells. *Transplantation* 2000; 70 (5): 723-730.
  45. Garcia JG, Schaphorst KL, Verin AD, Vepa S, Patterson CE, Natarajan V. Diperoxovanadate alters endothelial cell focal contacts and barrier function: role of tyrosine phosphorylation. *J. Appl. Physiol.* 2000; 89 (6): 2333-2343.
  46. Garcia JG, Verin AD, Schaphorst KL. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. *Semin. Thromb. Hemost.* 1996; 22 (4): 309-315.
  47. Garcia JGN. Concepts in microvascular endothelial barrier regulation in health and disease. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (1): 1-3.
  48. Gizewski ER, Rauen U, Kirsch M, Reuters I, Diederichs H, Groot HD. Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem. J.* 1997; 322 (Pt 3): 693-699.
  49. Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* 2005; 106 (9): 3242-3250.
  50. Gorovoy M, Niu J, Bernard O, Profirovic J, Minshall R, Neamu R, u. a. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (28): 26533-26542.
  51. Guan J-Q, Takamoto K, Almo SC, Reisler E, Chance MR. Structure and dynamics of the actin filament. *Biochemistry* 2005; 44 (9): 3166-3175.
  52. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell. Sci.* 1997; 110 (Pt 3): 357-368.
  53. Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Yin X-M, Gores GJ. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* 2005; 129 (1): 269-284.
  54. Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, u. a. ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59 (2): 470-478.
-



- 
55. Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, u. a. Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71 (4): 764-773.
  56. Hall SM, Evans J, Haworth SG. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993; 9 (1): 106-114.
  57. Hall SM, Komai H, Reader J, Haworth SG. Donor lung preservation: effect of cold preservation fluids on cultured pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1994; 267 (5 Pt 1): L508-517.
  58. Härtel FV, Rodewald CW, Aslam M, Gündüz D, Hafer L, Neumann J, u. a. Extracellular ATP induces assembly and activation of the myosin light chain phosphatase complex in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2007; 74 (3): 487-496.
  59. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1778 (3): 660-669.
  60. Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986; 231 (4735): 234-241.
  61. Hu G, Place AT, Minshall RD. Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem. Biol. Interact.* 2008; 171 (2): 177-189.
  62. Hu Y-L, Haga JH, Miao H, Wang Y, Li Y-S, Chien S. Roles of microfilaments and microtubules in paxillin dynamics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 348 (4): 1463-1471.
  63. Huang H, Salahudeen AK. Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: a critical step in cold storage-induced renal injury. *Am. J. Transplant.* 2002; 2 (7): 631-639.
  64. Huot J, Houle F, Rousseau S, Deschesnes RG, Shah GM, Landry J. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 1998; 143 (5): 1361-1373.
  65. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J. Hepatol.* 1996; 25 (5): 774-780.
  66. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; 284 (1): G15-26.
  67. Jalimarada SS, Shivanna M, Kini V, Mehta D, Srinivas SP. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 2009; 89 (3): 333-343.
  68. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33 (8): 1037-1046.
-

- 
69. Kerkweg U, Jacob M, de Groot H, Mannherz H-G, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 2003; 76 (3): 501-508.
  70. Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 2002; 35 (3): 560-567.
  71. Kevil CG, Okayama N, Alexander JS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability II: importance of tyrosine phosphatase and kinase activity. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2001; 281 (6): C1940-1947.
  72. Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2000; 279 (1): C21-30.
  73. Kim JS, Southard JH. Membrane stabilizing effects of calcium and taxol during the cold storage of isolated rat hepatocytes. *Transplantation* 1999; 68 (7): 938-943.
  74. Kim J-S, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 2003; 124 (2): 494-503.
  75. Knapp J, Bokník P, Lüss I, Huke S, Linck B, Lüss H, u. a. The protein phosphatase inhibitor cantharidin alters vascular endothelial cell permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289 (3): 1480-1486.
  76. Knoop S, de Groot H, Rauen U. Little evidence for a major role of Ca<sup>2+</sup> in cold-induced injury of liver cells. *Cryobiology* 2008; 56 (2): 103-113.
  77. Kuhne W, Besselmann M, Noll T, Muhs A, Watanabe H, Piper HM. Disintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 264 (5 Pt 2): H1599-1608.
  78. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2009; 11: E19.
  79. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J.* 2006; 273 (13): 3106-3117.
  80. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 129(4): 389-406.
  81. Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochem. Cell Biol.* 1995; 73 (9-10): 703-707.
  82. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, u. a. Mitochondrial permeability transition during hypothermic to

- normothermic reperfusion in rat liver demonstrated by the protective effect of cyclosporin A. *Biochem. J.* 1998; 336 (Pt 2): 501-506.
83. Lee JSY, Gotlieb AI. Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair. *Cardiovasc. Pathol.* 2002; 11 (3): 135-140.
84. Lee SH, Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol. Cells.* 2010; 29 (4): 311-25.
85. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl. Surg.* 1995; 1 (2): 124-138.
86. Li H, DeRosier DJ, Nicholson WV, Nogales E, Downing KH. Microtubule Structure at 8 Å Resolution. *Structure.* 2002; 10 (10): 1317-1328.
87. Li R, Soosairajah J, Harari D, Citri A, Price J, Ng HL, u. a. Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB J.* 2006; 20 (8): 1218-1220.
88. Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US. Modulation of HSP27 alters hypoxia-induced endothelial permeability and related signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 2009; 220 (3): 600-610.
89. Mangino MJ, Tian T, Ametani M, Lindell S, Southard JH. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation* 2008; 85 (3): 427-436.
90. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989; 48 (3): 463-468.
91. McKenzie JAG, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J. Cell. Physiol.* 2007; 213 (1): 221-228.
92. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46 (2): 178-191.
93. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 2006; 86 (1): 279-367.
94. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000; 7 (5): 291-306.
95. Molitoris BA, Leiser J, Wagner MC. Role of the actin cytoskeleton in ischemia-induced cell injury and repair. *Pediatr. Nephrol.* 1997; 11 (6): 761-767.
96. Molitoris BA, Sandoval R, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure. *Crit. Care Med.* 2002; 30 (5 Suppl): S235-240.

- 
97. Nguyen A, Chen P, Cai H. Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett.* 2004; 572 (1-3): 307-313.
  98. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 2002; 108(2): 233-246.
  99. Noll T, Hölschermann H, Koprek K, Gündüz D, Haberbosch W, Tillmanns H, u. a. ATP reduces macromolecule permeability of endothelial monolayers despite increasing  $[Ca^{2+}]$ . *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (6 Pt 2): H1892-1901.
  100. Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM. Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 1995; 268 (4 Pt 2): H1462-1470.
  101. Nowak JM, Grzanka A, Zuryń A, Stepień A. The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton. *Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2008; 62: 110-117.
  102. Ollinger K, Brunk UT. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 19(5): 565-574.
  103. Ollinger K, Roberg K. Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (38): 23707-23711.
  104. Ono S, Ono K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol.* 2002; 156 (6): 1065-1076.
  105. Ozawa M, Kemler R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (11): 6166-6170.
  106. Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 2004; 14 (7): 386-394.
  107. Pandey D, Goyal P, Bamburg JR, Siess W. Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets. *Blood* 2006; 107 (2): 575-583.
  108. Pawlak G, Helfman DM. MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (30): 26927-26933.
  109. Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, Garcia JGN, Verin AD. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 28 (5): 574-581.
  110. Petrat F, de Groot H, Rauen U. Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 376 (1): 74-81.
-

- 
111. Petrat F, de Groot H, Rauen U. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* 2001; 356 (Pt 1): 61-69.
  112. Petrat F, Rauen U, de Groot H. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* 1999; 29 (4): 1171-1179.
  113. Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.* 2002; 383 (3-4): 489-502.
  114. Petrat F, Weisheit D, Lensen M, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem. J.* 2002; 362 (Pt 1): 137-147.
  115. Pichon S, Bryckaert M, Berrou E. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J. Cell. Sci.* 2004; 117 (Pt 12): 2569-2577.
  116. Pless G, Sauer IM, Rauen U. Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant.* 2011; Epub ahead of print, DOI: 10.3727/096368911X580509.
  117. Post S, Rentsch M, Gonzalez AP, Palma P, Otto G, Menger MD. Importance of the first minutes of reperfusion in hepatic preservation injury. *Transplant. Proc.* 1995; 27 (1): 727-728.
  118. Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (1): 53-63.
  119. Qian SY, Buettner GR. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26 (11-12): 1447-1456.
  120. Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24 (7-8): 1316-1323.
  121. Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22 (1-2): 17-24.
  122. Rauen U, Hintz K, Hanssen M, Lauchart W, Becker HD, de Groot H. Injury to cultured liver endothelial cells during cold preservation: energy-dependent versus energy-deficiency injury. *Transpl. Int.* 1993; 6 (4): 218-222.
  123. Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low  $O_2^-/H_2O_2$  formation. *FASEB J.* 2000; 14 (13): 1953-1964.



124. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13 (1): 155-168.
125. Rauen U, de Groot H. Mammalian cell injury induced by hypothermia - the emerging role for reactive oxygen species. *Biol. Chem.* 2002; 383 (3-4): 477-488.
126. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J. Investig. Med.* 2004; 52 (5): 299-309.
127. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 2007; 54 (1): 77-86.
128. Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35 (12): 1664-1678.
129. Rauen U, Kerkweg U, Wusteman MC, de Groot H. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron: implications for corneal preservation. *Cornea* 2006; 25 (1): 68-77.
130. Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 2004; 40 (4): 607-615.
131. Rauen U, Springer A, Weisheit D, Petrat F, Korth H-G, de Groot H, u. a. Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities. *Chembiochem.* 2007; 8 (3): 341-352.
132. Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation* 2000; 70 (10): 1424-1431.
133. Salahudeen AK, Joshi M, Jenkins JK. Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 2001; 72 (5): 798-804.
134. Sastry SK, Burridge K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* 2000; 261 (1): 25-36.
135. Schaphorst KL, Pavalko FM, Patterson CE, Garcia JG. Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997; 17 (4): 443-455.
136. Shepard BD, Joseph RA, Kannarkat GT, Rutledge TM, Tuma DJ, Tuma PL. Alcohol-induced alterations in hepatic microtubule dynamics can be explained by impaired histone deacetylase 6 function. *Hepatology* 2008; 48 (5): 1671-1679.
137. Shivanna M, Rajashekhar G, Srinivas SP. Barrier dysfunction of the corneal endothelium in response to TNF-alpha: role of p38 MAP kinase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51 (3): 1575-1582.

- 
138. Shivanna M, Srinivas SP. Microtubule stabilization opposes the (TNF-alpha)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 2009; 89 (6): 950-959.
  139. Shivanna M, Srinivas SP. Elevated cAMP opposes (TNF-alpha)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. *Mol. Vis.* 2010; 16: 1781-1790.
  140. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118 (1): 183-191.
  141. Singh RP, Dhawan P, Golden C, Kapoor GS, Mehta KD. One-way cross-talk between p38-MAPK and p42/44-MAPK. Inhibition of p38-MAPK induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44-MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (28): 19593-19600.
  142. Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, u. a. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* 2005; 24 (3): 473-486.
  143. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87 (2): 243-253.
  144. Stasek JE Jr, Patterson CE, Garcia JG. Protein kinase C phosphorylates caldesmon77 and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J. Cell. Physiol.* 1992; 153 (1): 62-75.
  145. Stevens T, Garcia JGN, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279 (3): L419 -L422.
  146. Suurna MV, Ashworth SL, Hosford M, Sandoval RM, Wean SE, Shah BM, u. a. Cofilin mediates ATP depletion-induced endothelial cell actin alterations. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006; 290 (6): F1398-1407.
  147. Suzuki S, Bing H, Sugawara T, Matsuda Y, Tabata T, Hoshikawa Y, u. a. Paclitaxel prevents loss of pulmonary endothelial barrier integrity during cold preservation. *Transplantation* 2004; 78 (4): 524-529.
  148. Takei Y, Marzi I, Gao WS, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51 (5): 959-965.
  149. Tenopoulou M, Doulias P-T, Barbouti A, Brunk U, Galaris D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.* 2005; 387 (Pt 3): 703-710.
  150. Tenopoulou M, Kurz T, Doulias P-T, Galaris D, Brunk UT. Does the calcein-AM method assay the total cellular „labile iron pool“ or only a fraction of it? *Biochem. J.* 2007; 403 (2): 261-266.
-

- 
151. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* 2002; 39 (4-5): 173-185.
  152. Trocha SD, Kevil CG, Mancini MC, Alexander JS. Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins. *Ann. Surg.* 1999; 230 (1): 105-113.
  153. Turk B, Turk V. Lysosomes as „suicide bags“ in cell death: myth or reality? *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (33): 21783-21787.
  154. Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2 (12): E231-236.
  155. van Hinsbergh VWM, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J. Anat.* 2002; 200 (6): 549-560.
  156. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CML, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJP, van Hinsbergh VWM. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27 (11): 2332-2339.
  157. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Nègre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000; 102 (23): 2803-2809.
  158. van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascul. Pharmacol.* 2002; 39 (4-5): 257-272.
  159. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1123: 134-145.
  160. Verin AD, Birukova A, Wang P, Liu F, Becker P, Birukov K, u. a. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001; 281 (3): L565-574.
  161. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28 (2): 223-232.
  162. Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288 (3): H1296-1305.
  163. Werle B, Jülke B, Lah T, Spiess E, Ebert W. Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *Br. J. Cancer.* 1997; 75 (8): 1137-1143.
  164. Werneburg N, Guicciardi ME, Yin X-M, Gores GJ. TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 287 (2): G436-443.

- 
165. Wong MK, Gotlieb AI. Endothelial cell monolayer integrity. I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments. *Arteriosclerosis* 1986; 6 (2): 212-219.
  166. Wu K, Türk TR, Rauen U, Su S, Feldkamp T, de Groot H, u. a. Prolonged cold storage using a new histidine-tryptophan-ketoglutarate-based preservation solution in isogeneic cardiac mouse grafts. *Eur. Heart J.* 2011; 32 (4): 509-516.
  167. Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. *J. Physiol. (Lond.).* 2005; 569 (Pt 2): 359-366.
  168. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87 (1): 16-20.
  169. Yard B, Beck G, Schnuelle P, Braun C, Schaub M, Bechtler M, u. a. Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds. *Am. J. Transplant.* 2004; 4 (1): 22-30.
  170. Yuan SY. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vasc. Pharmacol.* 2002; 39 (4-5): 213-223.
  171. Zahrebelski G, Nieminen AL, al-Ghoul K, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study. *Hepatology* 1995; 21 (5): 1361-1372.
  172. Zieger MAJ, Gupta MP. Hypothermic preconditioning of endothelial cells attenuates cold-induced injury by a ferritin-dependent process. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 46 (5): 680-691.
  173. Crichton RR, Charloteaux-Wauters M. Iron transport and storage. *Eur. J. Biochem.* 1987; 164 (3): 485-506.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDA	2,6-Bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]- 8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7- tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
FAK	Focal Adhesion Kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HSP90	Heat Shock Protein 90
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IgG	Immunglobulin G
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
KH Lacto	Krebs-Henseleit-Lactobionat-Puffer
L15	Leibovitz-15-Zellkulturmedium
LDH	Lactatdehydrogenase
LIMK	LIM-Kinase
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop



MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MLC	Myosin Light Chain
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
NADH	Nicotinamide-Adenine Dinucleotide
PBS	Phosphate-buffered saline
ROCK	Rho-Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate
TSA	Trichostatin A
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VI	Vorincubation
z-FA-fmk	N-Benzyloxycarbonyl-Phenylalanine-Alanine-fluoromethyl ketone
z-IETD-fmk	N-Benzyloxycarbonyl-Isoleucine-Glutamate-Threonine-Aspartate-fluoromethyl ketone

## **8.2. Publikationen**

### **Referierte Publikationen**

Knoop S, Noll T, Rauen U. Involvement of microtubules and p38-MAPK in cold-induced loss of endothelial barrier integrity. In Vorbereitung.

Rauen U, Springer A, Knoop S, de Groot H, Sustmann R. A fluorescent sensor for chelatable iron ions in lysosomes and endosomes. In Vorbereitung.

Rauen U, Li T, Knoop S, Kerkweg U, Sustmann R, Rauen U. Role of lysosomes in cold-induced apoptosis of rat hepatocytes. In Vorbereitung.

### **Poster und Vorträge**

Knoop S, Noll T, Rauen U. Untersuchungen zum Mechanismus des kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Barrierefunktion. Vortrag, 15. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“, Xanten, 2009.

Knoop S, Noll T, Rauen U. Untersuchungen zum Mechanismus des kälteinduzierten Verlustes der endothelialen Barrierefunktion. Poster, 8. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, 2009.

Knoop S, Noll T, Rauen U. Involvement of microtubules and p38-MAPK in cold-induced loss of endothelial barrier integrity. Vortrag, 1. Doktoranden-Meeting des Forschungsschwerpunkts Transplantation, Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, 2011.

### **8.3. Lebenslauf**

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten"

#### **8.4. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Untersuchungen zur Beteiligung der Lysosomen und des Cytoskeletts  
an der kälteinduzierten Zell- und Gewebeschädigung“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Juli 2011

## **8.5. Danksagung**